

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Farmacocinética y depleción de residuos de tilosina en truchas
(*Oncorhynchus Mykiss*)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Nieto Escribano

Directores

**María Aránzazu Martínez Caballero
Irma Ares Lombán**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**FARMACOCINÉTICA Y
DEPLECIÓN DE RESIDUOS DE TILOSINA EN
TRUCHAS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

IRENE NIETO ESCRIBANO

Bajo la dirección de las Profesoras Doctoras

María Aránzazu Martínez Caballero
Irma Ares Lombán

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



FARMACOCINÉTICA Y

**DEPLECIÓN DE RESIDUOS DE TILOSINA EN
TRUCHAS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

TESIS DOCTORAL

IRENE NIETO ESCRIBANO

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

FARMACOCINÉTICA Y

DEPLECIÓN DE RESIDUOS DE TILOSINA EN

TRUCHAS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por

la Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Toxicología y Farmacología

IRENE NIETO ESCRIBANO

Madrid, 2015

IRENE NIETO ESCRIBANO

**FARMACOCINÉTICA Y
DEPLECIÓN DE RESIDUOS DE TILOSINA EN
TRUCHAS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

Directores:

Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero,

Profesora Titular de Toxicología

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Prof. Dra. Irma Ares Lombán

Profesora Contratado Doctor de Toxicología

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Trabajo financiado por el Proyecto Ref. UCM-BSGH/ GR3/14 de la *Universidad Complutense de Madrid*, por el Proyecto (ALIBIRD-CM Programa) Ref. S2013/ABI-2728 de la *Comunidad de Madrid*, y por el *Contrato de Colaboración entre el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y la Universidad Complutense de Madrid*.

Deseo expresar mi agradecimiento:

A mis Directores de Tesis Doctoral, Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología, y Prof. Dra. Irma Ares Lomban, Profesora Contratado Doctor de Toxicología, por la dirección de esta Memoria, por su confianza y por todas las enseñanzas que de forma tan generosa han contribuido a que esta Tesis pueda ser presentada.

A los Profesores Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Director del Departamento de Toxicología y Farmacología, y a la Dra. María Rosa Martínez Larrañaga, Catedrática de Toxicología, por su permanente apoyo y estímulo recibido a lo largo de este periodo de mi formación universitaria que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid por la ayuda recibida y en especial a la Dra. Alicia Inés Torres Muñoz, en la actualidad Profesora de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Panamá.

A D. Carlos San Miguel Bel, Presidente de la Organización de Productores de Acuicultura Continental y Director del Grupo IPEASA (Industrias Piscícolas Españolas Agrupadas, S.A.) y a todo su equipo del Centro Piscifactoría de Fuentidueña (Segovia), por su ayuda en el mantenimiento, tratamiento y recogida de muestras de los peces, acciones encuadradas en la fase experimental de esta memoria.

A mis seres queridos, familia y amigos, en especial a mis padres y mi hermana por todo su cariño y apoyo. Y finalmente a mi esposo Frank, por su comprensión, paciencia y ánimo.

A Frank y Ainhoa
mis almas gemelas



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

**Departamento de Toxicología
y Farmacología
Facultad de Veterinaria
28040 Madrid**

Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero, Profesora Titular de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

Prof. Dra. Irma Ares Lombán, Profesora Contratado Doctor de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN que D.^a IRENE NIETO ESCRIBANO

Ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada **“Farmacocinética y Depleción de Residuos de Tilosina en Truchas (*Oncorhynchus mykiss*)** en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, a veintiuno de septiembre de dos mil quince.

Prof. Dra. María Aránzazu Martínez Caballero

Prof. Dra. Irma Ares Lombán

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. Origen y aspectos generales de la Tilosina.....	7
2.1.1. Estructura química y propiedades físico-químicas.....	7
2.1.2. Relación estructura-actividad	14
2.2. Acción farmacológica.....	16
2.2.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano.....	16
2.2.2. Resistencia.....	24
2.3. Farmacocinética.....	25
2.4. Toxicidad.....	49
2.4.1. Toxicidad aguda.....	49
2.4.2. Toxicidad subcrónica.....	52
2.4.3. Toxicidad crónica.....	54
2.4.4. Otros estudios toxicológicos.....	55
2.5. Indicaciones terapéuticas.....	60
2.6. Control de residuos de Tilosina A en productos alimenticios de origen animal.....	64
2.7. Justificación del trabajo y objetivos.....	70
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
3.1 Protocolo y diseño experimental.....	73
3.1.1. Estudio farmacocinético de tilosina en truchas (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	73

3.1.2. Estudio de distribución y depleción tisular en truchas (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	79
3.2. Método analítico de tilosina A en plasma y tejido de truchas (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	81
3.3. Análisis de datos.....	84
3.4. Fármacos y reactivos.....	90
4. RESULTADOS	91
4.1. Farmacocinética de tilosina tras su administración única oral en truchas (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	91
4.1.1. Niveles plasmáticos de tilosina A tras administración única oral	91
4.1.2. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras administración única oral.....	94
4.2. Farmacocinética de tilosina tras su administración múltiple oral de tilosina durante 5 días en truchas (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	96
4.2.1. Niveles plasmáticos de tilosina A tras administración múltiple oral.....	96
4.2.2. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras administración múltiple oral.....	100
4.3. Distribución y depleción tisular de tilosina tras su administración múltiple oral en truchas (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	105
5. DISCUSIÓN	113
6. CONCLUSIONES	119
7. BIBLIOGRAFÍA	122

1. RESUMEN

Introducción. La tilosina, antibiótico de amplio uso en medicina veterinaria, pertenece al grupo de los antibióticos macrólidos. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en la bacteria. La tilosina es una mezcla de cuatro fracciones Tilosina A, Tilosina B, Tilosina C y Tilosina D. La Tilosina A es el componente mayoritario (normalmente constituye un 90% de la mezcla y nunca menos del 80%). La tilosina ha sido incluida en el Anexo I del Reglamento No 37/2010 de la Comisión para uso en todas las especies productoras de alimentos incluyendo peces, estableciéndose un Límite Máximo de Residuos (LMR). La tilosina presenta una acción esencialmente bacteriostática frente a bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas, así como otros organismos como micoplasma, espiroquetas, clamidia y rickettsia. Presenta valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) entre 0,2 y 1 µg/ml frente a varias bacterias y micoplasmas patógenos susceptibles. En la literatura existen trabajos publicados de farmacocinética de tilosina en ganado bovino, caprino, ovino, perros y aves, en los que tras administración intramuscular la tilosina se distribuye ampliamente a tejidos y presenta una alta biodisponibilidad. Sin embargo, no existen estudios realizados en peces. Dado que es necesario conocer la disposición de un fármaco en la especie estudiada para diseñar un adecuado régimen de dosificación, los objetivos del presente trabajo han sido: (i) describir el comportamiento cinético de la tilosina tras administración oral única y múltiple en trucha arcoriris (*Oncorhynchus mykiss*) y (ii) evaluar la depleción de tilosina A en tejido comestible (músculo + piel) tras administración oral múltiple.

Material y Métodos. Se utilizaron 250 truchas arcoriris (*Oncorhynchus mykiss*) sanas de pesos entre 190 y 210 g. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los requerimientos éticos. Los animales fueron distribuidos en tres grupos (Grupo 1 de 180 truchas, Grupo 2 de 49 truchas y Grupo 3 de 20 truchas). Fueron tratados con una dosis oral de 40 mg/kg p.c. de tilosina en el pienso con una concentración de tilosina de 4 g/kg de pienso. Las truchas se mantuvieron a una temperatura del agua de 18°C. El grupo 1 (180 truchas) y el Grupo 2 (49 truchas) recibieron una dosis oral de tilosina de 40 mg/kg p.c. cada 24 horas durante 5 días consecutivos. Fueron anestesiadas con 2-fenoxietanol y se tomaron muestras de sangre a partir de la vena caudal de los animales del Grupo 1 a los tiempos de 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h y 24 h tras la primera y quinta administración de la dosis y a los tiempos de 4 h, 8 h, 12 h y 24 h tras la segunda,

tercera y cuarta administración). Las muestras de sangre se centrifugaron y se recogió individualmente el plasma que se almacenó a -45°C hasta el posterior análisis de las concentraciones de tilosina A. Los peces del Grupo 2 fueron sacrificados a los 0,125 (n=7), 1 (n=7), 3 (n=7), 5 (n=7), 7 (n=7), 10 (n=7) y 14 (n=7) días tras la última administración de tilosina. Las concentraciones de tilosina A en plasma y tejido (músculo + piel) se analizaron usando una técnica de HPLC-MS. Las concentraciones plasmáticas de tilosina A se midieron con un sistema HPLC-MS equipado con una columna ACE C18-AR (100 x 2.1mm I.D. 5 μm). La fase móvil fue una mezcla de acetato de amonio 10mM: ácido fórmico 0,5%: metanol (35:10:55). La curva de concentraciones medias plasmáticas vs tiempo fue analizada usando el programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El método analítico fue validado cumpliendo los criterios de validación linealidad, especificidad, precisión, exactitud recomendados por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para los métodos analíticos utilizados en la evaluación de los residuos de medicamentos veterinarios en los tejidos comestibles de animales productores de alimentos. Las áreas de los picos en los cromatogramas se cuantificaron usando la técnica del estándar externo por el uso de soluciones de referencia estándar de tilosina (Tilosina A). Las curvas de calibrado para la tilosina A fueron lineales en un rango de 0,001-10 $\mu\text{g/ml}$ (0,001-10 $\mu\text{g/g}$ de tejido músculo + piel). El límite de cuantificación (LOQ) fue de 0.001 $\mu\text{g/ml}$ para plasma o 0.001 $\mu\text{g/g}$ para tejido. La recuperación media de tilosina A en plasma fue $> 90\%$ y del $>70\%$ en tejido (músculo + piel). La precisión intra-día e inter-día presentó un coeficiente de variación $< 5,5\%$

Resultados y Discusión. Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados a partir de la curva de las concentraciones medias plasmáticas de tilosina frente al tiempo usando el programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA)

Las curvas de las concentraciones medias plasmáticas de tilosina A frente al tiempo tras administración oral (40 mg/kg b.w./día durante 5 días consecutivos) obtenidas, se ajustaron adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético. La absorción oral fue rápida, como refleja de semivida de absorción que fue 1,380 h y el tiempo al que se alcanzó la concentración máxima (T_{max}) de 2,740 h. La concentración plasmática máxima (C_{max}) fue 4,087 $\mu\text{g/ml}$. La semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) fue 5,569 h. Las concentraciones plasmáticas de tilosina disminuyeron lentamente, presentándose niveles

del antibiótico en un rango de 0,633 a 0,958 µg/ml a las 12 h tras la administración y en un rango de 0,221 a 0,309 µg/ml a las 24 h tras la administración. Se determinaron los residuos de tilosina A en tejido (músculo + piel) tras la administración de tilosina (40 mg/kg p.c./día durante 5 días consecutivos). Las concentraciones medias de tilosina A en tejido fueron 438,57 µg/kg a las 3 h tras la última administración de tilosina. Las concentraciones de tilosina A en músculo + piel disminuyeron rápidamente. Las concentraciones del residuo marcador (tilosina A) estuvieron por debajo del LMR en todas las muestras tisulares a los 3 días tras la última administración de tilosina. La EMEA recomienda el uso de un programa de regresión lineal para el cálculo del tiempo de espera o de retirada. Usando este programa, el tiempo de retirada de la tilosina para músculo + piel tras administración oral múltiple (40 mg/kg p.c./día, 5 días) fue de 3 días.

Conclusión. Este estudio presenta las propiedades farmacocinéticas y depleción de residuos de tilosina en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). El estudio aporta datos para un uso prudente de tilosina en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sugiriendo un posible régimen de dosificación y un tiempo de espera o de retirada tras el tratamiento como medida de seguridad alimentaria para el consumidor.

ABSTRACT

Introduction. Tylosin, a drug mainly used in veterinary medicine, belongs to the macrolide group of antibiotics. It inhibits bacterial protein synthesis by blocking the translocation step. Tylosin consists of a mixture of the macrolides Tylosin A, Tylosin B, Tylosin C and Tylosin D. Tylosin A is by far the major component (usually about 90% and not less than 80%). The Regulation (EC) No 37/2010 (Annex I) listed the active substance tylosin to be used in all food producing species including fish with a Maximum Residue Limit (MRL) established. Tylosin is a lipid-soluble organic base (pKa = 7,1) with 40% binding to serum proteins, a high degree of lipid solubility and a low degree of ionisation. It has a broad, essentially bacteriostatic action against many Gram-positive and some gram-negative bacteria, as well as against other organisms, including mycoplasma, spirochetes, chlamydiae and rickettsiae. Tylosin is an antibiotic with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 0.2 to 1 µg/ml for various susceptible bacterial and mycoplasma pathogens. Pharmacokinetic studies of tylosin have been reported in cows, ewes, calves, goats, dogs, and birds. In most studies, i.m. administration of tylosin led to high tissue distribution and satisfactory

bioavailability. Although the responses of cattle, sheep, goats, pigs and poultry to tylosin are documented, there are no pharmacokinetic studies in fish, due to the difficulties of working with fish. Because the knowledge of the disposition of a drug in each species is desirable for the design of a satisfactory dosage regime, **the objectives of the present study were:** (i) to describe the kinetic behavior of tylosin following single and multiple oral dose in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and (ii) to evaluate the depletion of tylosin A in edible tissues (muscle + skin) after multiple oral dose.

Material and Methods. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ranging in weight from 190 to 210 g were used. The study was undertaken in accordance with the ethics requirements. Approximately 250 rainbow trout, were randomly divided into three main groups (Group 1 with 180 fish, Group 2 with 49 fish, and Group 3 with 20 fish). Fish which were treated at the single oral dose of 40 mg/kg bw received the feed mixed with tylosin at the concentration of 4 g/kg feed. The water temperature of 18°C. Group 1 (180 fish) and Group 2 (49 fish) received tylosin orally at a nominal dose rate of 40 mg tylosin/kg bw every 24 h over five days. Following anesthetization with 2-phenoxy-ethanol of fish of Group 1, blood samples were collected from caudal vein using a heparinized syringe at different time periods (0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h and 24 h post-administration after first and fifth dose and 4 h, 8 h, 12 h and 24 h after second, third and fourth dose). Plasma was isolated by centrifugation of the blood. Plasma samples were immediately frozen and stored at -45°C until assayed for concentrations of tylosin A. Fish of Group 2 were euthanized by decapitation at 0.125 (n=7), 1 (n=7), 3 (n=7), 5 (n=7), 7 (n=7), 10 (n=7) and 14 (n=7) days after the last dose of tylosin. Fish were immediately exsanguinated and tissue specimens (2 g) of muscle + skin were collected separately. Each of the tissue specimens was carefully weighed and stored frozen at -45°C until assayed for concentrations of tylosin A. Plasma and tissue concentrations of tylosin were measured using a HPLC-MS technique. Plasma concentrations of tylosin were measured by HPLC-MS system equipped with a column ACE C18-AR (100 x 2.1mm I.D. 5µm). The mobile phase consisted of a mixture of ammonium acetate 10 mM: 0.5 % formic acid: methanol (35:10:55). Mean plasma concentration vs time curve was analyzed using Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) program. The analytical method was validated for recovery rate, linearity, specificity, accuracy and precision as indicated in the

recommendations for analytical methods for veterinary drug residues in tissues by European Medicines Evaluation Agency (EMA). Drug concentrations were determined from peak areas and the use of calibration curves obtained by running plasma and tissue samples from fish not administered tylosin that were spiked with known concentrations of tylosin A. For plasma and tissue specimens, the calibration curves were linear and reproducible for concentrations ranging from 0.001 to 10.00 µg/ml (or 0.001–10.00 µg/g tissue) for tylosin A. The limit of quantification (LOQ) was 0.001 µg/ml for plasma or 0.001 µg/g for tissue. Mean analytical recovery exceeded 90% in the plasma and 70% in tissue for tylosin A. Within-day and between-day assay coefficients of variation were <5.5%.

Results and Discussion. Standard pharmacokinetic parameters were calculated from the relationship between mean plasma concentrations versus time using the computer Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) program. Tylosin plasma disposition curves after repeated oral administration (40 mg/kg b.w., daily for 5 days) were best described by a two-compartmental open model. Oral absorption was rapid, as reflected by the half-life for this process which was 1.380 h and the time for the maximum plasma concentration (T_{max}) of 2.740 h. The maximum plasma concentration (C_{max}) was 4.087 µg/ml. The elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) following oral administration was 5.569 h. Tylosin plasma concentrations decreased slowly and plasma antimicrobial levels in range of 0.633 to 0.958 µg/ml were detectable up to 12 h post-administration, and in a range of 0.221 to 0.309 µg/ml were detectable up to 24 h post-administration. Residues of tylosin in tissue specimens (muscle + skin) after oral administration of tylosin (40 mg/kg b.w. daily for 5 consecutive days) were determined. Mean tissue concentrations of tylosin A of 438.57 µg/kg were measured 3 h after administration of the last dose of tylosin. The tylosin concentrations depleted rapidly from the muscle + skin tissue. Marker residue concentrations (tylosin A) were below the MRL value in all samples 3 days after the end of treatment. Numerous experimental designs and statistical approach are used to establish the withdrawal time. EMA recommends use of a linear regression technique as the method of choice. Using this approach, the withdrawal time for tylosin calculated for muscle + skin tissue after oral administration (40 mg/kg b.w., daily for 5 consecutive days) was 3 days.

Conclusion. This study shows the pharmacokinetic properties and tissue depletion of tylosin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Our study provides data for a more prudent use of tylosin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) suggesting a possible rational dosing and a withdrawal time after treatment in order to guarantee safety in foods for the consumers.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Origen y aspectos generales de la Tilosina

La tilosina es un fármaco usado fundamentalmente en la práctica veterinaria, perteneciente al grupo de los antibióticos macrólidos (Brisson-Noel *et al.*, 1988), producido por la fermentación de una cepa del microorganismo, *Streptomyces fradiae* (Roberts *et al.*, 2009).

Los macrólidos se usan para el tratamiento de enfermedades comunes en animales productores de alimentos y para la medicación de grandes grupos de animales (medicación en masa). El primer macrólido se descubrió en los años 50 fue la eritromicina, se trató de una sustancia orgánica producida por el actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea*, anteriormente conocido como *Streptomyces erythraeus* (Zhanel *et al.*, 2001). El primer macrólido usado en medicina veterinaria fue la espiramicina, se introdujo su uso en los años 60, seguido de la eritromicina y la tilosina (Prescott 2008). En la Unión Europea en el 2004 se autorizó para cerdos un antibiótico químicamente modificado de la tilosina, la acetilisovaleruiltilosina (EMA, 2009).

Los macrólidos se han categorizado como “críticamente importantes” en medicina humana (OIE, 2007; Collignon *et al.*, 2009). La priorización de las clases de antimicrobianos se ha dirigido principalmente en términos del manejo de riesgo para uso exclusivo en animales. Así se han seleccionado 3 grupos de antimicrobianos como críticamente importantes en medicina humana: las quinolonas, las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, y los macrólidos (WHO, 2007). En el hombre, los macrólidos (principalmente azitromicina, telitromicina, claritromicina) son comunmente usados para el tratamiento de infecciones respiratorias, infecciones cutáneas e infecciones del tracto genital. Son de elección para el tratamiento de la campylobacteriosis en casos que se requiera una terapia antimicrobiana. También se utilizan para el tratamiento de la *Legionella* y en infecciones multi-resistentes por *Salmonella* (WHO, 2007).

2.1.1. Estructura química y propiedades físico-químicas

El término macrólido designa la estructura química constituida por un anillo lactónico macrocíclico de gran tamaño al cual se unen diversos desoxiazúcares. Actualmente se conocen más de 2000 compuestos en los que el tamaño del anillo varía

desde 8 hasta 62 átomos, aunque en la práctica el nombre de macrólidos se reserva a la familia de antibióticos formada por compuestos con anillo macrocíclico lactónico de 14, 15 ó 16 átomos de carbono al que se unen mediante enlaces glucosídicos uno o varios azúcares neutros o básicos (Bryskier *et al.*, 1993; Giner *et al.*, 1995; Kucers *et al.*, 1997; Shiomi y Omura, 2002).

Los macrólidos se clasifican de acuerdo al número de átomos que contengan un anillo lactona, existiendo miembros de entre 12 y 16 átomos (Yao y Moellering 2007). Los macrólidos de 12 átomos ya no se utilizan, siendo los más comunes los macrólidos de 14, 15 y 16 átomos (Mensa *et al.*, 2003). Concretamente la tilosina pertenece al grupo de anillo de 16 átomos de carbono (Brisson-Noel *et al.*, 1988).

La clasificación de los macrólidos según su número de carbonos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los macrólidos según su número de carbonos.

14 carbonos	15 carbonos	16 carbonos
Eritromicina*	Azitromicina	Tilosina*
Oleandomicina	Gamitromicina*	Espiramicina*
Roxitromicina	Tulatromicina*	Josamicina
Fluritromicina		Diacetilmidecamicina
Claritromicina		Rokitamicina
Diritromicina		Mideacamicina
Telitromicina		Miocamicina
		Rokitamicina
		Tilmicosina*
		Tilvalosina*

*Sustancias aprobadas para su uso veterinario

(Bryskier *et al.*, 1993; Giner *et al.*, 1995; Kucers *et al.*, 1997; Shiomi y Omura, 2002; Bryskier y Butzler 2003; Giguère 2006).

En los años 90 se introdujo en medicina humana una nueva generación de macrólidos semisintéticos, conocidos como azálidos, entre los cuales se encuentra la azitromicina. Este grupo se caracteriza por tener un átomo de nitrógeno insertado en los anillos lactona (Ballow y Amsden 1992; Bryskier y Butzler 2003). El primer azálido aprobado para uso en animales en la Unión Europea fue la gamitromicina en el 2008. Por su parte, los ketólidos son un grupo de antibióticos desarrollado recientemente

(Bryskier 2000; Hamilton-Miller y Shah 2002), presentan anillo de 14 carbonos con una función keto en la posición 3 (Xiong y Le 2001; Bryskier y Butzler 2003). Poseen actividad frente a estreptococos que han demostrado ser resistentes a los macrólidos (Shain y Amsden 2002; Pfister, Jenni *et al.*, 2004). Se han desarrollado nuevos macrólidos para su uso en veterinaria, la tulatromicina, un macrólido semisintético con 3 grupos amino, se autorizó para su uso en ganado bovino y ovino en la Unión Europea, es una mezcla de los macrólidos de anillos de 13 y 15 carbonos. A los macrólidos con esta estructura se les conoce como triamilidas (EMA, 2009).

La tilosina representa la mezcla de 4 derivados de la tilosina producidos por una cepa de *Streptomyces fradiae*, cuya estructura química se puede apreciar en la Figura 1. El componente mayor de la mezcla (>80%) es tilosina factor A, adicionalmente la componen pequeñas cantidades de otros tres factores, desmicosina (factor B), macrosina (factor C) y relomicina (factor D) (Hamill *et al.*, 1961; McGuire *et al.*, 1961; Whaley *et al.*, 1963; Hamill y Stark, 1964; EMEA, 2000), cuya cantidad varía dependiendo de la fuente de fabricación (Roberts *et al.*, 2009). Los 4 componentes contribuyen a la potencia de la tilosina, la cual no es menor de 900 IU/mg, calculada con la referencia de la sustancia en polvo (European Pharmacopoeia, 2004), siendo la tilosina factor A el componente con mayor potencial microbiológico (EMEA, 2000). La actividad antimicrobiana relativa de los derivados de la tilosina son: tilosina A -1.0, tilosina B – 0.83, tilosina C – 0.75 y tilosina D – 0.35 (Teeter y Meyerhoff, 2003). El metabolito dihidrodesmicosina tiene aproximadamente el 31% de la actividad microbiológica de la tilosina A (Roberts *et al.*, 2009).

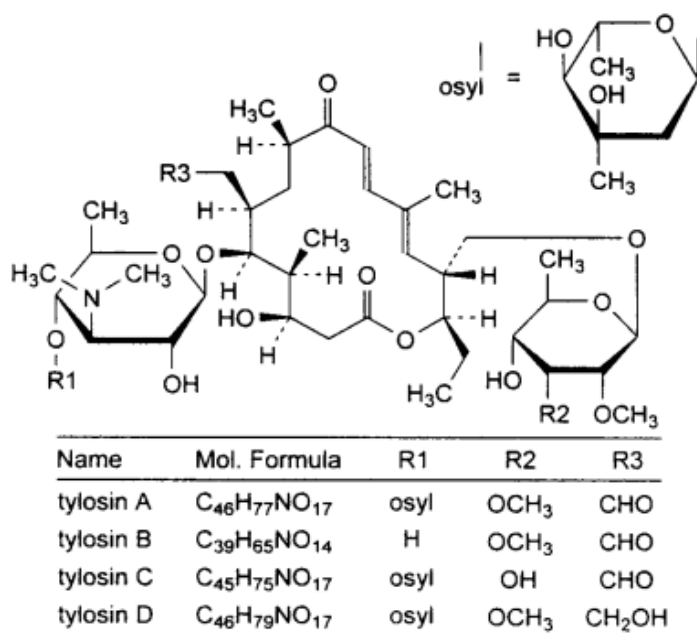


Figura 1. Estructura química de la tilosina (FAO, 2008)

La tilosina A contiene un anillo lactona policétido (tilactona) sustituido con 3 azúcares 6-deoxihexosas (Figura 2). La adición de la D-mycaminosa al aglicona continúa con la oxidación del anillo en C-20 y C-23 (para generar el residuo tilonolida) y la sustitución con L-micarosa y 6-desoxi-D-alosa. La Bis-O-metilación de este último genera micinosa y de este modo se completa la biosíntesis de la tilosina (Baltz *et al.*, 1983; Baltz y Seno, 1988).

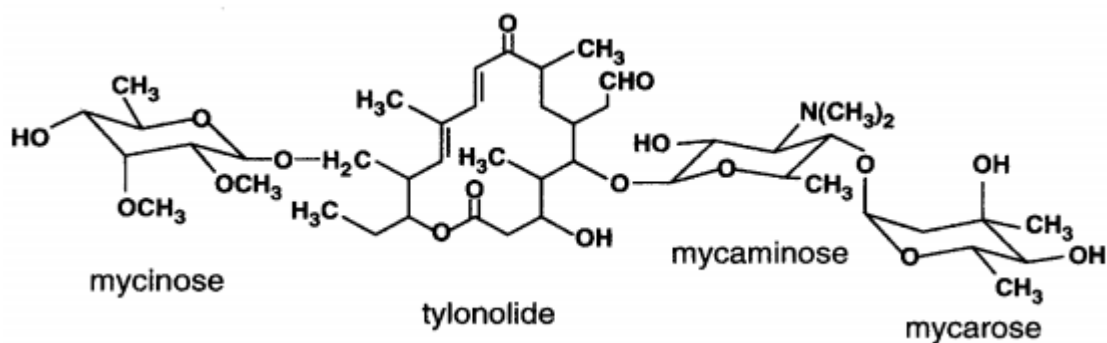


Figura 2. Estructura química de la tilosina A (FAO, 2008)

Se han aislado otros compuestos farmacológicamente activos, como por ejemplo: lactenocina, demecinosil-tilosina (DMT) y O-micaminosil-tilonolida (OMT), mediante fermentación media o de muestras comerciales acuosas que contienen tilosina. En

soluciones inyectables que contienen tilosina, se ha detectado un producto de la degradación alcalina llamado aldol-tilosina (TAD), aislándose dos epímeros de este producto, TAD1 y TAD2, así como isotilosina A (isoTA) (Paesen *et al.*, 1995abc). Más recientemente se han identificado dos productos fotoreactivos de la tilosina en agua, alcohol isotilosina A (isoTA1) y aldol-isotilosina A (isoTA2) (Hu y Coats, 2007; Hu *et al.*, 2008).

Los nombres químicos de la tilosina son los siguientes (FAO, 2008):

- Nombre de la Farmacopea Europea: (4R, 5S, 6S, 7R, 9R, 11E, 13E, 15R, 16R) – 15 - [[(6 – deoxi - 2,3 – di – O – metil – β – D - alopiranosil) oxi] metil] – 6 - [[3,6 – dideoxi – 4 – O - (2,6 – dideoxi – 3 – C – metil – α – L – ribo - hexopiranosil) - 3 - (dimetilamino) – β – D - glucopiranosil] oxi] – 16 – etil – 4 – hidroxil - 5,9,13 – trimetil – 7 - (2 - oxoetil) oxaciclohexadeca - 11,13 – dieno - 2,10 – diona.

- Nombre IUPAC: 2 - [12 - [5 - (4,5 – dihidroxil - 4,6 – dimetil – oxan – 2 - il) oxi – 4 – dimetilamino – 3 – hidroxil – 6 – metil – oxan – 2 - il] oxi – 2 – etil – 14 – hidroxil – 3 - [(5 – hidroxil - 3,4 – dimetoxil – 6 – metil – oxan – 2 - il) oximetil] - 5,9,13 – trimetil - 8,16 – dioxo – 1 – oxaciclohexadeca - 4,6 – dien – 11 - il] acetaldehído.

- Otros nombres químicos:

• 6S, 1R, 3R, 9R, 10R, 14R) - 9 - [((5S, 3R, 4R, 6R) – 5 – hidroxil - 3,4 - dimetoxil – 6 – metilperidropiran – 2 - iloxil)metil]–10–etil–14–hidroxil–3,7,15–trimetil–11–oxa–4,12–dioxociclohexadeca–5,7–dienil}etanal

• Oxaciclohexadeca - 11,13 – dieno – 7 - acetaldehído, 15 - [[(6 – deoxi - 2,3 – dimetil – β -D-alopiranosil) oxi] metil] -6- [[3,6-dideoxi-4-O-(2,6-dideoxi-3-C-metil- α -L-ribo-hexopiranosil) – 3 - (dimetilamino) – β – D - glucopiranosil] oxi] – 16 – etil – 4 – hidroxil-5,9,13-trimetil-2,10-dioxo-[4R-(4R*,5S*,6S*,7R*,9R*,11E,13E,15R*,16R*)]

Y presenta los siguiente sinónimos: AI3-29799, EINECS 215-754-8, Fradycin (Fradizine), HSDB 7022, Tilosina (INN-Spanish), Tylan, Tylocine, Tylosin, Tylosine, Tylosine (INN-French), Tylosinum (INN-Latin), Vubityl 200 (FAO, 2008).

En cuanto a las propiedades físico-químicas la tilosina presenta las siguientes características (FAO, 2008):

- Fórmula molecular: C₄₆H₇₇NO₁₇
- Peso molecular: 916.1
- Ingrediente puro activo: el principal componente de la mezcla es tilosina A (80%)
- Apariencia: polvo cristalino de color casi blanco o ligeramente amarillo
- Punto de fusión: 128-132°C
- Solubilidad: 5 mg/ml (agua a 25°C), soluble en alcohol, ésteres, cetonas, hidrocarburos clorinados, benceno, éter, acetona, cloroformo
- Absorción UV: UV_{max} a 282 nm; el coeficiente de extinción (E_{1cm} 1%) es 245 a 282 nm
- Estabilidad: las soluciones son estables a pH 4-9 (máxima estabilidad a pH 7) (Merk, 1976). Por debajo de pH 4 se forma tilosina B (desmicosina) como resultado de la hidrólisis ácida; con pH neutro o alcalino se forma aldol-tilosina (TAD) junto con productos polares de degradación de identidad desconocida; cuando la solución de tilosina se expone a la luz del día se forman dos productos de la fotodegradación: alcohol isotilosina A (isoTA1) y aldol-isotilosina A (isoTA2).
- pK_a: 7,73
- log P (octanol-agua): 1.63
- Número CAS: CAS 1401-69-0 (Lewicki *et al.*, 1991)

La tilosina contiene 2 carbohidratos sustitutos: un disacárido formado por micaminosa y residuos de micarosa en la posición 5 del anillo lactona de 16 carbonos, y el residuo de micinosa en la posición 14; desmicosina (Figura 3 (2)) difiere de la tilosina

en la ausencia del residuo de la micarosa. Estos macrólidos contienen un grupo acetaldehído reactivo en la posición 6 del anillo. Hay un gran número de derivados de la tilosina y desmicosina modificados por el grupo aldehído. Estos compuestos mantienen actividad antibacterial (Matsubara *et al.*, 1983; Kirst *et al.*, 1988; Debono *et al.*, 1989; Hranjec *et al.*, 2002). Sin embargo los derivados peptídicos de la tilosina y desmicosina no se han obtenido todavía (Sumbatyan *et al.*, 2003). Un grupo aldehído se puede modificar vía formación de un sustituto oxima. Para este fin se sintetizó un péptido que contenía la función hidroxilamina: se obtuvo un metil éster del péptido protegido basado en Boc-alanina y metil alanina, el cual después de retirar el grupo Boc se condensó con ácido aminooxiacético. El metil ester aminooxiacetil-L-alanil-L-alanina (Figura 3 (3)) se obtuvo por bloqueo del péptido. La síntesis de este derivado se llevó a cabo en la solución de dimetilformamida usando N,N'-d ciclohexilcarbodiimida como agente condensante en la presencia de 1-hidroxibenzotriazol. Los grupos protectores Boc se retiraron con ácido trifluoacético (Sumbatyan *et al.*, 2003).

La condensación de los antibióticos con el ester metil aminooxiacetil-L-alanil-L-alanina vía grupo aldehído se hizo bajo condiciones análogas a las desarrolladas para la ligadura con la formación de oxima para otros tipos de compuestos (Ingallinella *et al.*, 2001; Zatsepin *et al.*, 2002; Vandersse *et al.*, 2003). La reacción se realizó en agua pH 5.7, con concentraciones iniciales de tilosina y desmicosina de 0.02M, incubando la mezcla a 37°C durante 12 horas. Los derivados resultantes de la tilosina (Figura 3 (4)) y desmicosina (Figura 3 (5)) se extrajeron con cloroformo y cristalizaron con éter. Los productos 4 y 5 (Figura 3) se purificaron para estudios biológicos empleando TLC en placas de sílica gel con cloroformo:metanol (7:3 v/v). La pureza de los compuestos obtenidos se verificó por TLC y HPLC. La estructura se confirmó por espectrofotometría de masas y técnicas analíticas de aminoácidos cuantitativos, los cuales indican la presencia de residuos de alanina en los productos 1 y 2 (Figura 3). Los análisis preliminares revelan que los derivados peptídicos de la tilosina y la desmicosina inhiben la síntesis de proteínas en el sistema transcripción-traslación no celular con eficacia comparable a los antibióticos sin modificar. Por lo tanto, los compuestos obtenidos son prometedores para su uso en estudios topográficos de cadenas de polipéptidos nacientes en el túnel ribosomal (Sumbatyan *et al.*, 2003).

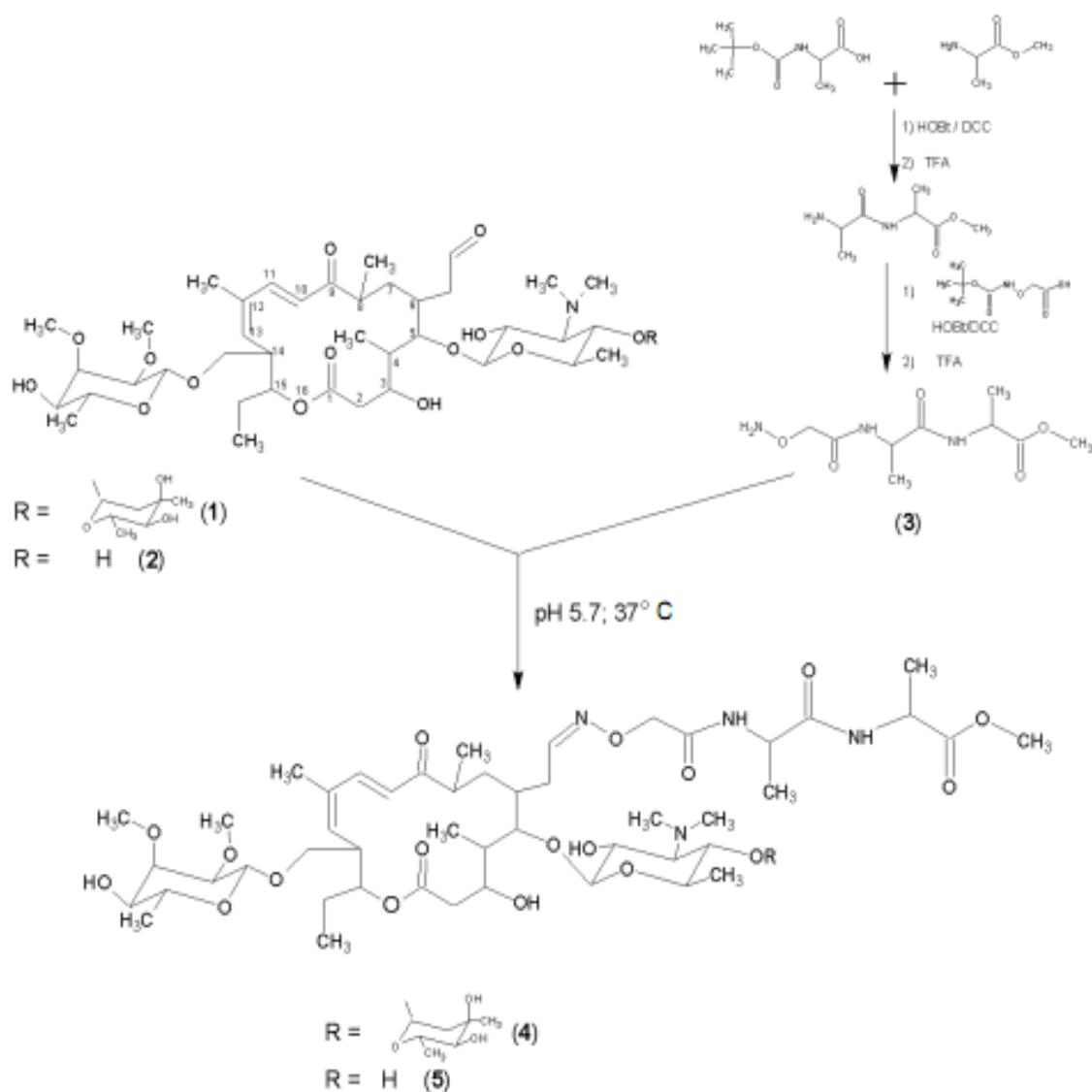


Figura 3. Esquema de la síntesis químico de los péptidos derivados de la tilosina y desmicosina (FAO, 2008)

2.1.2. Relación estructura-actividad

La molécula de la tilosina consiste predominantemente de tilosina A (factor A) y de diferentes cantidades de tilosina factor B (desmicosina), tilosina factor C (macrosina) y tilosina factor D (relomicina) pueden también estar presentes, dependiendo de la fuente de fabricación. La mayor actividad microbiológica reside en la tilosina A. Los estudios de seguridad llevados a cabo usaron tilosina en forma comercial con una

especificación de tilosina A de al menos del 80% y la suma de tilosina A, B, C y D de al menos del 95%. (FAO, 2008).

La dihidroxidesmicosina tiene una actividad microbiológica con una potencia estimada del 31% de la tilosina A, siendo detectable por ensayo microbiológico de la tilosina (Sieck *et al.*, 1978b).

Según Lakritz *et al.*, 1999 la valoración de antibióticos macrólidos usando ensayos microbiológicos es equivalente los resultados con HPLC sin diferencias significativas. El ensayo microbiológico ha sido usado también para determinar las concentraciones de tilosina en leche (Litterio *et al.*, 2007).

Los bioensayos no diferencian entre la tilosina y sus metabolitos activos. En conejos se ha reportado la N-metilación de la tilosina como un metabolito microbiológicamente activo de la tilosina (Carletti *et al.*, 2003). Este metabolito no ha sido descrito en otras especies (Al Wabel, 2008). Cuando se determina el régimen de dosificación de un fármaco es recomendable medir la actividad antimicrobiana total, sin diferenciar entre la actividad del compuesto padre y el metabolito (Dowling *et al.*, 1995).

Generalmente su acción es bacteriostática tiempo-dependiente (Giguère, 2006), aunque en algunos se ha encontrado cierta actividad bactericida de los macrólidos de la nueva generación contra algunas especies bacterianas en condiciones experimentales, aunque la actividad es limitada comparada con otras clases de antibióticos (Seral *et al.*, 2003).

Los resultados de la evaluación comparativa antibacterial entre tilosina A y tilosina B demuestran que ambos compuestos tienen casi la misma actividad antibacteriana. En ese mismo estudio, la tetrahydro-desmicosina y la dihydro-desmicosina mostraron menor actividad antimicrobiana (Iveković *et al.*, 2003). Además, la 4'-deoxy-10,11,12,13-tetrahydro-desmicosina, un derivado de la tetrahydro-desmicosina, mantiene el espectro antimicrobiano de la tilosina pero con algunas mejoras contra los estafilococos y *Haemophilus influenzae* sensibles a tilosina (Narandja *et al.*, 1995).

2.2. Acción farmacológica

2.2.1. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano

Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas por unión a la subunidad 50S del ribosoma. Los lugares de unión de los macrólidos es a nivel del 23S ARNs de la subunidad 50S. También favorecen la disociación del peptidil-tARN de los ribosomas durante la translocación (Brisson-Noel *et al.*, 1988; Zhanel *et al.*, 2001; Gaynor y Mankin, 2005; Giguère, 2006). Ejercen su efecto mediante su unión al sitio P en la subunidad ribosomal 50S, muy probablemente en etapas iniciales de la síntesis de proteínas cuando bloquean el crecimiento de la cadena peptídica naciente por inhibición de la traslocación del aminoacil ARNt y por ende la síntesis de polipéptidos bacterianos. La acción antimicrobiana de estos agentes es complementada por su efecto inhibidor en la asociación de las subunidades ribosomales mayores que conlleva a la depleción gradual de los ribosomas funcionales de la célula. El mecanismo de acción de los macrólidos es compartido por otros grupos de antibióticos como los fenicoles y las lincosamidas. Por esta razón pueden interferir con la acción de esos antimicrobianos (Douthwaite, S. 2001; Douthwaite y Champney, 2001).

Se ha sugerido que los macrólidos de 16 anillos inhiben la síntesis de proteínas por bloqueo de la elongación de la cadena peptídica, pero los macrólidos de 14 y 15 anillos sólo tienen potencial inhibidor de la síntesis proteica mediante el mRNA (Retsema y Fu, 2001). También se ha demostrado que los macrólidos de 16 anillos (carbomicina, espiramicina y tilosina) inhiben la peptidil transferasa y la presencia de micarosa se ha relacionado con la inhibición de la peptidil transferasa. Sin embargo, la tilosina B no inhibe la peptidil transferasa (Poulsen *et al.*, 2000).

Los macrólidos tienen un amplio espectro, esencialmente bacteriostático que es tiempo dependiente (Guigere, 2006). Son activos contra importantes patógenos tanto humanos como animales y su espectro en general cubre desde bacterias Gram-positivas, tales como estreptococos, estafilococos, enterococos y *Arcanobacterium pyogenes*, bacterias Gram-negativas como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Campylobacter* spp., muchas bacterias anaerobias como *Brachyspira* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp. y *Clostridium* spp. y otros organismos tales como *Lawsonia* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Bordetella* spp., *Moraxella* spp., *Leptospira* spp. y *Spirocheta* spp.

Pero es necesario considerar que existen diferencias marcadas entre los diferentes macrólidos en cuanto al espectro de acción (Hardy *et al.*, 1988; Bryskier y Butzler 2003). Concretamente la tilosina es efectiva contra un amplio abanico de bacterias Gram-positivas, varias Gram-negativas, bacterias anaerobias, así como contra otros organismos incluyendo micoplasmas, espiroquetas, clamidias y rickettsias (Prescott y Baggot, 1993; Gutiérrez y Rodríguez, 1993; EMEA, 1997; Prats *et al.*, 2002a; FAO, 2008;). Es microbiológicamente activa frente a las bacterias presentes en la flora intestinal humana (Roberts *et al.*, 2009). El espectro antimicrobiano de la tilosina incluye algunos de los principales patógenos para la ubre bovina: estreptococos β -hemolíticos, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pyogenes* y *Mycoplasma* spp. (Jasper *et al.*, 1966; Schalm y Jasper, 1970), siendo sin embargo inefectiva frente a enterobacterias (EMEA, 1997).

La mayoría de las bacterias ensayadas mostraron ser susceptibles a la tilosina, pero dentro de ellas las anaerobias Gram-positivas fueron más susceptibles que las Gram-negativas. *Bifidobacterium* spp. y *Clostridium* spp. Tuvieron los valores de CMI₅₀ más bajo (0,062 μ g/ml). La tilosina no mostró actividad frente a cepas de *E.coli* (CMI₅₀ >128 μ g/ml) (Roberts *et al.*, 2009).

La calibración de las pruebas de sensibilidad para macrólidos es difícil para muchas especies, porque las pautas para la determinación de concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) no cubren todos los microorganismos, debido principalmente a condiciones de cultivo exigentes que presentan algunas especies (Schwarz *et al.*, 2010).

Gingerich y colaboradores (1977) evaluaron la actividad antimicrobiana de la tilosina mediante el método de susceptibilidad Kirby-Bauer en varias cepas bacterianas de origen animal. La sensibilidad *in vitro* de los microorganismos sensibles se determinó por el método de dilución en tubo. Como resultados obtuvieron una concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus*, estreptococos β -hemolíticos y *Corynebacterium pyogenes* de <1 μ g/ml para la mayoría de cepas estudiadas, pero la CMI para *Pasteurella* spp. fue de 12,5 μ g/ml. Asimismo, se determinaron concentraciones de tilosina en suero y leche de vacas después de la administración intravenosa e intramuscular de una dosis de 12,5 mg/kg p.c. de tilosina, detectándose concentraciones <1 μ g/ml en suero pero > 1 μ g/ml en leche. Estos

hallazgos sugieren que *Staphylococcus aureus*, estreptococos β -hemolíticos y *Corynebacterium pyogenes* pueden ser considerados susceptibles a tilosina en la medida en que la CMI de tilosina para estos microorganismos es terapéuticamente viable, particularmente en leche. Se debería considerar a *Pasteurella* spp. resistente a tilosina porque no se pudieron hallar concentraciones terapéuticamente efectivas en ganado a dosis razonables. *Staphylococcus aureus*, estreptococos β -hemolíticos, *Corynebacterium pyogenes* y *Pasteurella* spp. mostraron zonas de inhibición alrededor de los discos 30 μ g Kirby-Bauer. Los organismos que se aislaron y fueron resistentes a tilosina cuando se ensayaron por el método Kirby-Bauer incluyeron α -estreptococos, coliformes y otros organismos Gram negativos. También se encontraron dos cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* de origen canino. La determinación de la CMI de tilosina para cada organismo disco-susceptible proporcionó más información cuantitativa sobre su verdadera susceptibilidad. Todos los organismos disco-susceptibles aislados de ganado fueron susceptible a concentraciones de tilosina $<1\mu\text{g/ml}$, excepto *Pasteurella* spp., para la cual la CMI fue de 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados de la CMI para cepas aisladas de origen equino y canino fueron similares, las cuales apoyan las conclusiones anteriores. *Mycoplasma* spp. también resultó susceptible a tilosina a concentraciones $< 0,09\ \mu\text{g/ml}$ (Gingerich *et al*, 1977). En otros estudios se emplearon dosis de 12,5 mg/kg p.c. de tilosina, siendo casi tres veces la dosis recomendada para ganado (4,4 mg/kg). Según los resultados, incluso a una dosis más alta, concentraciones de 12,5 mg/kg de tilosina (la CMI para *Pasteurella* spp.) no son terapéuticamente viables en ganado independiente de la ruta de administración. Estos hallazgos sugieren que *Pasteurella* spp. se debería considerar resistente a tilosina incluso aunque hayan aparecido cepas susceptible cuando se ensayaron por disco de 30 μ g Kirby-Bauer (Gingerich *et al.*, 1997). Este descubrimiento está acorde tanto con los ensayos terapéuticos como con los estudios de sensibilidad a antibióticos llevados a cabo en un gran número de casos de neumonía en ganado, en los cuales la CMI de tilosina para la cepa de *Pasteurella* spp. más sensible fue de 16 $\mu\text{g/ml}$ (Hjerpe, 1979).

Otros autores sitúan la CMI de la tilosina en unos valores entre 0,2 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para varias especies patógenas sensibles de bacterias y micoplasmas (Burrows, 1980; Tindall, 1991). Taha y colaboradores (1999) reportan unas concentraciones plasmáticas después de la administración intramuscular superiores que la media de los valores CMI necesarios para la mayoría de organismos sensibles. Además, las concentraciones

máximas se alcanzaron dentro de las 3-4 horas y los niveles terapéuticos se mantuvieron altos durante varias horas. Esto indica que la tilosina administrada por cualquier ruta alcanza concentraciones plasmáticas dentro del rango terapéutico (Taha *et al.*, 1999).

Atef *et al.* (1991) describió en cabras que los niveles de tilosina en plasma y orina permanecían más altos que las CMI para la mayoría de los organismos sensibles durante más de 18 h después de una inyección im de 15 mg/kg. Una dosis intravenosa de 10 mg/kg cada 24 h en vacas provocó concentraciones efectivas de tilosina en las secreciones genitales más altas que la CMI (0,032–0,063 µg/ml) de una de las cepas de *Actinomyces pyogenes* responsable de metritis en vacas (Cester *et al.*, 1993). Sin embargo en un estudio de camellos a dosis de 20 mg/kg im que parecía ser demasiado baja para dar concentraciones séricas del fármaco, tuvieron potencial clínico para el tratamiento de patógenos asociados con infecciones respiratorias (Ziv *et al.*, 1995).

Sin embargo, para otros autores la tilosina no debería ser considerada un antibiótico de amplio espectro, pues consideran que posee un este limitado espectro de actividad. Según estos estudios las concentraciones de 1 µg/ml en suero no fueron constantes después de la administración intramuscular, a pesar de haber utilizado una dosis alta. Las concentraciones de tilosina en líquido sinovial, medida en dos vacas, fueron análogas pero no excedieron la concentración en suero. En leche las concentraciones de tilosina >1 µg/ml fueron fácilmente alcanzadas y mantenidas. Estos hallazgos sugieren que, con la posible excepción de organismos en leche, sólo los microorganismos que se inhiben con concentraciones de tilosina < 1 µg/ml deberían considerarse susceptibles puesto que concentraciones superiores no son terapéuticamente viables (Gingerich *et al.*, 1997). Los resultados de este estudio están en concordancia con resultados de estudios anteriores (McGuire *et al.*, 1981). El objetivo de la terapia antibiótica es suministrar una concentración adecuada de fármaco en el sitio de la infección y mantener esa concentración durante el tiempo deseado. Las concentraciones de tilosina en leche son altas, porque la leche representa un compartimento extravascular fluido que es de rápido acceso para el fármaco. Los resultados de este estudio sugieren que la inyección intramuscular de tilosina puede ser una opción razonable de tratamiento para mastitis bovina. Si el mantenimiento de la actividad antimicrobiana en leche puede ser correlacionada con la eficacia clínica, entonces una dosis considerablemente más baja de 12,5 mg/kg, puede ser efectiva,

mientras que las concentraciones de tilosina en leche fueran más altas que la CMI para los organismos anteriormente mencionados. Sin embargo, el pH de la leche mastítica a menudo se aproxima al pH del plasma, 7,4. Bajo esas condiciones se esperaría que el ratio leche:plasma fuera cercano a 1, un patrón de difusión menos favorable terapéuticamente para la terapia antimastítica. En otros fluidos corporales, se ve poco probable que la tilosina alcance altas concentraciones después de una administración intramuscular. La eficacia clínica en otras enfermedades infecciosas del ganado probablemente dependería de la sensibilidad a la tilosina de los microorganismos implicados (Gingerich *et al.*, 1997).

En otro estudio más reciente se determinó la CMI de tilosina en 100 cepas bacterianas comunes de la microflora intestinal humana. Las bacterias se aislaron de heces de voluntarios sanos los cuales no habían recibido ningún antibiótico en los 3 meses anteriores a la recolección de muestras, ni tampoco habían tenido síntomas de diarrea en las 4 semanas anteriores. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 2. La actividad de la tilosina fue considerable en la mayoría de las cepas, sin embargo con las cepas de *E. coli* no hubo actividad antibacterial. Las más susceptibles fueron las anaerobias Gram positivas, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus*. La CMI₅₀ de *Bifidobacterium* spp. y *Clostridium* spp. fue de 0,062 µg/ml (Pridmore, 2006).

Tabla 2. Valores de la CIM de tilosina en la microflora humana

Microflora*	Densidad del inoculado (x 10 ⁸ ufc/ml)	Valores CMI (µg/ml)			
		Rango CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Media geométrica de la CMI
<i>Bacteroides fragilis</i>	1,5 – 5,8	0,5 – 128	1	32	2,6
<i>Bacteroides</i> (otras especies)	1,8 – 12	0,25 – 32	0,5	32	1,3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0,34 – 6,5	0,031 – 2	0,062	1	0,12
<i>Clostridium</i> spp.	0,21 – 13	0,031 – 0,5	0,062	0,25	0,094
<i>Enterococcus</i> spp.	1,3 – 5,6	1 – 4	1	4	2,0
<i>Eubacterium</i> spp.	0,46 – 2,4	0,125 – 1	0,25	0,5	0,31
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,46 – 3,4	0,062 – 64	1	4	1,5
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,23 – 8	0,5 – 8	2	8	2,0
<i>Peptostreptococcus</i>	0,33 – 5,5	0,125 – 0,5	0,5	0,5	0,41
<i>Escherichia coli</i>	2,3 – 59	>128	>128	>128	>128

ufc: unidades formadoras de colonias

*10 aislados por microorganismos 100 aislados en total

En lo referente a la dosis de tilosina se han reportado un rango amplio de dosis, basado en las variaciones de especies en cuanto a farmacocinética y en la sensibilidad de los microorganismos, generalmente la tilosina se considera más efectiva frente a micoplasmas que frente a bacterias (Taha *et al.*, 1999). Prescott y Baggot (1993) recomiendan una dosis intravenosa de 35 mg/kg cada 8-12 h para el tratamiento de infecciones causadas por *Mycoplasma mycoides spp. capri* en cabras. Por su parte Hjerpe y Routen (1976) sugieren una dosis intramuscular de 44 mg/kg de tilosina tartrato cada 24 h en ganado.

También se han estudiado los efectos de la tilosina en los cultivos iniciadores del yogur por el Laboratorio Nacional de Referencia de Francia. Las concentraciones máximas de tilosina sin efecto en los fermentos lácticos fueron de 0,075 µg/ml para *Streptococcus thermophilus* y 0,004 µg/ml para *Lactobacillus bulgaricus*. Se advirtió que *Streptococcus thermophilus* era siempre el primer cultivo por lo que se concluyó que una concentración de 0,075 µg/ml era la máxima concentración de tilosina sin efecto en la industria de fabricación del yogur. Sin embargo, una publicación alemana reportó que la tilosina a concentraciones de 50 µg/ml inhibía algunos parámetros, incluyendo la formación de D-lactato en 2 cultivos iniciadores de yogur comercialmente disponibles (EMEA, 1997).

La Tabla 3, recoge como resumen la actividad antimicrobiana de tilosina frente a bacterias de interés en clínica veterinaria.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de la tilosina frente a bacterias de interés en clínica veterinaria

Microorganismo	Especie animal	CMI ₅₀ mg/ml	CMI ₉₀ mg/ml	Referencia
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Porcino	16	64	Kim <i>et al.</i> , 2001
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Bovino y porcino	≤ 0,06	> 64	Trinh <i>et al.</i> , 2002
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Porcino	> 256	> 256	Karlsson <i>et al.</i> , 2002; Hidalgo <i>et al.</i> , 2009
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	Porcino	> 512	> 512	Kinyon <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium difficile</i>	Porcino	0,25	>64	Post and Songer, 2004
<i>Clostridium perfringens</i>	Aves	64	> 256	Gharaibeh <i>et al.</i> , 2010
	Porcino	0,5	16	Masiero <i>et al.</i> , 2012
	Pavo	≤ 0,5	1	Gad <i>et al.</i> , 2011
	Conejo	0,5	32	Saggiorato <i>et al.</i> , 2008

Continuación **Tabla 3**

<i>Clostridium spiroforme</i>	Conejo	256	256	Agnoletti <i>et al.</i> , 2009
<i>Dichelobacter nodosus</i>	Ovino	1	1	Jiménez <i>et al.</i> , 2004
<i>Enterococcus faecalis</i>	Canino	1	≥128	De Graef <i>et al.</i> , 2004
	Bovino	1,56	>100	Kojima <i>et al.</i> , 2009
	Porcino	>100	>100	Kojima <i>et al.</i> , 2009
	Pollos	>100	>100	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000; Kojima <i>et al.</i> , 2009
	Gallinas ponedoras	>100	>100	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
<i>Enterococcus faecium</i>	Gallinas ponedoras	1,56	3,13	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Bovino	1,56	3,13	Kojima <i>et al.</i> , 2009
	Porcino	3,13	>100	Kojima <i>et al.</i> , 2009
	Pollos	100	>100	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000; Kojima <i>et al.</i> , 2009
<i>Escherichia coli</i>	Porcino	64	64	Choi <i>et al.</i> , 2002
	Canino	128	128	Awji <i>et al.</i> , 2012
<i>Fusobacterium necrogenes</i>	Ovino	4	8	Jiménez <i>et al.</i> , 2004
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Ovino	2	8	Jiménez <i>et al.</i> , 2004
<i>Fusobacterium russii</i>	Ovino	0,5	8	Jiménez <i>et al.</i> , 2004
<i>Fusobacterium spp.</i>	Ovino	0,5	8	Jiménez <i>et al.</i> , 2004
<i>Fusobacterium ulcerans</i>	Ovino	4	8	Jiménez <i>et al.</i> , 2004
<i>Fusobacterium varium</i>	Ovino	16	16	Jiménez <i>et al.</i> , 2004
<i>Haemophilus parasuis</i>	Porcino	20	> 20	Martín de la Fuente <i>et al.</i> , 2007
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Bovino	16	32	Esaki <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	Ovino	0,292	0,525	Loria <i>et al.</i> , 2003
<i>Mycoplasma bovis</i>	Bovino	0,39	0,78	Siugzdaite <i>et al.</i> , 2012
<i>Mycoplasma capricolum</i>	Caprino	< 0,03	< 0,03	Al-Momani <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Bovino	8	64	Uemura <i>et al.</i> , 2010
	Porcino	0,5	1	Jin <i>et al.</i> , 2014
<i>Mycoplasma mycoides</i>	Ovino y caprino	0,06	1	Al-Momani <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	Ovino y caprino	0,12	0,12	Al-Momani <i>et al.</i> , 2006
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Bovino	64	128	Post <i>et al.</i> , 1991
<i>Pasteurella multocida</i>	Bovino	32	64	Post <i>et al.</i> , 1991
<i>Staphylococcus aureus</i>	Canino	2	4	Awji <i>et al.</i> , 2012
	Bovino	1	2	Bonnier <i>et al.</i> , 2006
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Canino	8	64	Awji <i>et al.</i> , 2012
<i>Streptococcus canis</i>	Canino	1	64	Awji <i>et al.</i> , 2012
<i>Streptococcus uberis</i>	Bovino	0,5	64	Bonnier <i>et al.</i> , 2006

En relación a los peces, animal experimental objeto de nuestra memoria, es importante considerar que ciertas enfermedades bacterianas producen importantes pérdidas económicas en los sistemas productivos acuícolas. Gran parte de las bacterias patógenas afectan distintamente a peces de agua dulce o salada, y solo algunas de ellas

tienen la capacidad de infectar a ambos grupos. Entre las bacterias patógenas de peces podemos citar los siguientes grupos:

- **Bacterias filamentosas:** Flavobacterias.

- **Bacilos Gram (-) aerobios y anaerobios facultativos:** es el grupo más extenso y que generalmente provoca más problemas sanitarios. Entre ellos encontramos a *Enterobacteriaceae* como *Yersinia* y *Edwardsiella*; *Vibrionaceae* como *Vibrio*, *Listonella* y *Photobacterium*; *Aeromonadaceae* como *Aeromonas* y Rickettsiáceas como *Piscirickettsia*.

- **Cocos y bacilos Gram (+) :** *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Renibacterium*.

- **Bacilos ácido alcohol resistentes (AAR):** Micobacterias.

No se han descrito datos de actividad antimicrobiana de tilosina en patógenos aislados de peces.

Para el estudio de patologías producidas por bacterias en acuicultura se deben tener en cuenta distintos parámetros a analizar como el propio pez (especie, estado fisiológico y edad), el microorganismo patógeno, las condiciones ambientales (fluctuaciones en el nivel de oxígeno, salinidad, temperatura, etc.) y los factores inherentes al manejo del pez (alta densidad de población, limpieza de tanques, clasificación de peces, etc.), para así estudiar correctamente la susceptibilidad del pez a contraer la enfermedad. En muchos casos la patología se produce debido a aquellos microorganismos habituales del aparato digestivo de los peces que se hacen patógenos debido a situaciones de estrés de tipo ambiental o alimentario. En otros muchos casos la causa de la patología son agentes etiológicos primarios cuya virulencia o capacidad de reproducción se ven alterados por cambios y alteraciones en factores ecológicos o biológicos. En muchos casos, las irritaciones en la piel y mucosas del animal debido a contaminantes o tratamientos preventivos y otras lesiones cutáneas pueden favorecer la penetración de bacterias. La sintomatología de las enfermedades bacterianas se relaciona frecuentemente con alteraciones en la natación, peso, hidropesía, respuesta inflamatoria y hemorragias internas o externas que pueden producir o no necrosis. Las principales infecciones bacterianas que se dan en peces son aquellas producidas por

bacterias de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia* y *Renibacterium*. *Mycobacterium marinum* produce la tuberculosis de los peces.

2.2.2. Resistencias

El uso de agentes antimicrobianos en animales aumenta la posibilidad de transferencia de genes resistentes desde las bacterias animales a las humanas (Murray, 1998). El amplio uso de la tilosina en animales ha acelerado la aparición de cepas patogénicas resistentes a macrólidos en humanos y aumentado la resistencia cruzada con eritromicina (Roberts *et al.*, 1999).

La primera especie bacteriana que adquirió resistencia a los macrólidos fue *Staphylococcus*, demostrando resistencia a eritromicina (Zhanel *et al.*, 2001; Roberts 2008). Posteriormente más de 67 diferentes genes huéspedes en más de 58 especies bacterianas se han descrito en el contexto de la resistencia a macrólidos que incluyen *Pasteurellaceae*, *Streptococcal*, *Campylobacter* y *Enterococcus* especies.

Se han identificado los siguientes mecanismos de resistencia adquirida de los macrólidos (Douthwaite, 2001; Douthwaite y Champney, 2001; Mensa *et al.*, 2003; Lovmar *et al.*, 2009).

- Aparición de cambios estructurales del lugar de unión del macrólido al ribosoma
- Existencia de bombas de expulsión activa del macrólido a partir de la bacteria (exoflujo activo)
- Inactivación enzimática del macrólido por enzimas inactivantes

Las modificaciones del lugar de unión al ribosoma pueden consistir en:

- Metilación de un residuo de adenina o cambios en la secuencia de bases del ARNr 23S o alteraciones de la proteína ribosómica L4 por acción de una metilasa (genes *emr*). Los macrólidos de 16 átomos, clindamicina y telitromicina no inducen la actividad de la metilasa porque carecen de este azúcar.
- Mutaciones introduciendo sustituciones de bases en posición A2058 del ARNr 23S (Vester y Douthwaite, 2001), siendo el más relevante o el único mecanismo de resistencia en ciertos patógenos como *Brachyspira*

hyodysenteriae, *B. pilosicoli*, y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Karlsson *et al.*, 1999; Karlsson *et al.*, 2004; Stakenborg *et al.*, 2005), así como en *Campylobacter jejuni* y *C. coli* (Gibreel y Taylor, 2006; Alfredson and Korolik, 2007; Caldwell *et al.*, 2008).

- Mutaciones en genes que codifican 23S ARNs 23S.
- Mutaciones que afectan los genes que codifican las proteínas ribosomales L4 y L22 son menos estudiadas.

2.3. Farmacocinética

Las características farmacocinéticas (Tabla 4) y la depleción en tejidos para los antibióticos macrólidos están relacionadas con sus propiedades estructurales y fisicoquímicas (Baggot y Gingerich, 1976; Carlier *et al.*, 1987; Ziv *et al.*, 1995). Químicamente los macrólidos son bases débiles con una alta liposolubilidad, cuya actividad es altamente dependiente del pH, con una actividad óptima a un pH mayor de 7. Estas propiedades físico-químicas hacen que en cuanto a farmacocinética los macrólidos se caractericen por alcanzar grandes volúmenes de distribución y una amplia penetración a tejidos, encontrándose altas concentraciones intracelulares y acumulándose específicamente en células fagocíticas (Madgwick *et al.*, 1989; Bryskier y Butzler 2003; Barcia-Macay *et al.*, 2006). Presentan una absorción incompleta después de la administración oral y se eliminan principalmente por riñón, otra porción variable se excreta por bilis como compuesto padre o metabolitos. Esto le permite entrar en el ciclo entero-hepático y prolongar su vida media. Tanto si se administran vía oral o parenteral, los macrólidos tienen efectos sobre la microflora intestinal (Giguère 2006).

Los macrólidos semisintéticos desarrollados recientemente poseen un bajo aclaramiento, la vida media de eliminación de la tulatromicina en bovino y ovino es cercana a los 4 días y la gamitromicina en bovino alrededor de 2 días. Se absorben rápido desde el sitio de inyección, con una biodisponibilidad alrededor del 90% (EMA, 2009).

Tabla 4. Características farmacocinéticas de la tilosina

Absorción oral limitada (rápida en ratas)
Absorción parenteral completa
Buena distribución y amplia penetración en tejidos y fluidos corporales
Volumen de distribución de 1-4,6 l/kg según especie
Excreción renal principalmente
Metabolismo Hepático
Circulación enterohepática
Prolongada vida media de eliminación

La farmacocinética de los compuestos varía entre las diferentes especies animales, y por tanto la extensión y duración de los efectos farmacológicos. De ahí la importancia de disponer de datos farmacocinéticos comparativos entre diferentes especies animales (Taha *et al.*, 1999). En el caso concreto de la tilosina, ha sido objeto de estudios farmacocinéticos en diversas especies de animales (Ziv *et al.*, 1995; Kowalski *et al.*, 2002; Parts *et al.*, 2002a; Saurit *et al.*, 2002), entre los que podemos señalar los trabajos realizados en terneros (Burrows *et al.*, 1983), perros (Duthu, 1985), cabras (Atef *et al.*, 1991), especies aviarias (Locke *et al.*, 1982), ovejas lactantes (Al-Wabel, 2008) y camellos (Ziv *et al.*, 1995).

La tilosina es una base orgánica débil, con un bajo grado de ionización y altamente liposoluble ($pK_a = 7.73$), que rápidamente forma sales o ésteres, uniéndose a proteínas séricas moderadamente (30-47%), por ello se distribuye ampliamente a través de tejidos y fluidos corporales (Gingerich *et al.*, 1977; Burrows, 1980). Las formas disponibles de tilosina son: tilosina base, tartrato de tilosina y tilosina fosfato (McFarland *et al.*, 1997; European Pharmacopoeia, 2004). El volumen de distribución (V_d) es de 1-14,6 l/kg en diversas especies animales. Aunque los estudios farmacocinéticos comparativos de tilosina en animales están pobremente descritos en la literatura científica, existen revisiones disponibles (Wilson, 1984; WHO, 1991). Se han reportado estudios farmacocinéticos en vacas, terneros, cabras y perros (Prats *et al.*, 2002a).

A continuación se resumen algunos estudios farmacocinéticos realizados sobre la tilosina en diferentes especies animales. En peces, animal elegido en la presente memoria, no se han descritos estudios farmacocinéticos en la literatura científica.

Absorción

Animales de laboratorio

Ratas

En el caso de los roedores la tilosina se absorbe rápidamente después de la administración oral. Posteriormente de una única dosis oral de 50 mg/kg p.c. de tilosina base o tartrato de tilosina en ratas, se observaron picos de concentración en suero de $\leq 1,0$ $\mu\text{g/ml}$ después de 1-2 horas. Dentro de las 7 horas, las concentraciones en suero disminuyeron por debajo del límite de detección ($\text{LOD} = 0,10$ $\mu\text{g/ml}$) del ensayo microbiológico (WHO, 1991). Se obtuvieron resultados similares en ratas después de la administración intragástrica de una solución de tilosina base. Después de una única dosis de 20, 50 o 100 mg/kg p.c. de tilosina base, aparecieron picos de concentración de suero de 0,5-1,1 $\mu\text{g/ml}$ a las dos horas (Kietzmann, 1985). Cuando a las ratas se les administró una mezcla de agua con una preparación comercial disponible de tilosina base, con una concentración final alrededor de 71 $\mu\text{g/ml}$, el bioensayo de suero después de 1-10 días de medicación continua no reveló concentraciones detectables de tilosina ($< 0,1$ $\mu\text{g/ml}$), mientras que en pulmón contenía 3,93-18,14 μg tilosina/g (Carter *et al.*, 1987).

En ratas, el valor de V_d reportado por Duthu (1985) de 2.2 l/kg fue similar a los valores de V_d calculados para otras especies animales (Lewicki, 2006). La eliminación de la tilosina del plasma es rápido en ratas, con un tiempo medio de eliminación de 0,4 horas después de la administración intravenosa y un aclaramiento o clearance (Cl_b) de 86 ml/min/kg (Duthu, 1985). En ratón se observó un Cl_b similar de 70,9 ml/min/kg (Cacciapuoti *et al.*, 1990).

Perros

Se trató a perros con una dosis por cápsula vía oral de 1, 10 o 100 mg/kg p.c. durante 8 días, dos horas después de la última dosis se determinaron unas concentraciones de tilosina en sangre entre $< 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ y 9,5 $\mu\text{g/ml}$ (WHO, 1991). En otro estudio los perros recibieron una dosis de 25 o 100 mg/kg p.c. de tilosina base vía oral por cápsula diariamente durante 29 días demostrando unos picos de concentraciones en suero de 1,4-2,7 $\mu\text{g/ml}$ a las 2-5 horas después de la dosificación con 100 mg/kg p.c./día (FAO/WHO, 1991). En un estudio aparte, no hubo evidencia de la

acumulación de tilosina en suero después de 2 años de administración continua de tilosina en la dieta (Anderson *et al.*, 1966b). También en perros de raza Beagle se determinó la magnitud y duración de los niveles de tilosina en sangre después de la administración intramuscular de tilosina (van Duyn y Kline, undated-a). Se administró la tilosina dosis de 11 mg/kg p.c. cada 12 horas durante un día. La tilosina se absorbió rápidamente después de cada aplicación produciendo dos curvas de niveles sanguíneos muy parecidas durante el periodo de 24 horas. Los niveles en suero alcanzaron 1,9 y 1,7 µg/ml, respectivamente, a las 12 horas aproximadamente post inyección antes de disminuir aproximadamente a 0,1 µg/ml a las 10 horas.

En otro estudio se aplicó una inyección intramuscular de tilosina de 11 mg/kg p.c. a 5 perros con pesos entre 5-9 kg. Las muestras de sangre se recogieron a las 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas después de la administración y se analizó la actividad microbiológica en el suero. La media de la concentración de tilosina en sangre a las dos horas después de dosificar fue de 5 µg/ml a 0,5 h y 2,5 µg/ml a la hora. A las 10 horas después de la administración, los niveles en sangre de tilosina estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo (0,1 µg/ml) (van Duyn *et al.*, undated).

En otro estudio, se aplicó a 6 perros dos inyecciones intramusculares de 11 mg de tilosina/kg p.c. cada 12 horas. Se recogieron muestras de sangre en intervalos de 2 horas hasta 24 horas después de la primera inyección y se analizaron para ensayar la actividad de la tilosina. Las concentraciones máximas (C_{max}) en sangre de tilosina fueron de 1,9 µg/ml y 1,7 µg/ml aproximadamente a los 2 horas después de cada inyección. No se detectó tilosina pasadas las 12 horas (van Duyn y Kline, undated-b).

Otros investigadores estudiaron la farmacocinética de la tilosina en perros después de una única dosis intravenosa, observando valores de 1,7 l/kg para el volumen de distribución (V_d), para el aclaramiento o clearance (Cl_b) de 21,9 ml/min/kg y una semivida plasmática de eliminación (t_{1/2e}) de 0,9 horas (Weisel *et al.*, 1977).

Gatos

A 6 gatos (3 machos y 3 hembras) se les administró 2 inyecciones intramusculares de tilosina a una dosis de 11 mg/kg p.c. cada inyección con un espacio de tiempo de 12 horas entre cada inyección. Se recogieron muestras de sangre cada dos horas después de la primera aplicación hasta 24 horas. En este caso la tilosina alcanzó la concentración

máxima ($0,0 \mu\text{g/ml}$) a las 2 horas después de cada inyección y desaparece en sangre a las 12 horas aproximadamente (Van Duyn y Kline, undated-d).

Animales productores de alimentos

Bovinos

El pico de concentración de la tilosina en sangre en vacas se alcanzó a las 2-4 horas después de la administración intramuscular de tilosina base en 50% de propilenglicol o en una solución acuosa de sal de tartrato (Sauter *et al.*, 1962; Gingerich *et al.*, 1977). En terneros se administró una dosis de tilosina base de $17,6 \text{ mg/kg p.c.}$, alcanzando concentraciones máximas desde $2,07$ hasta $2,3 \mu\text{g/ml}$ a las 2 horas después de la inyección intramuscular (van Duyn y Folkerts, 1979). Después de la administración intratraqueal de tilosina base a dosis de 25 mg/kg p.c. a terneros resultaron concentraciones máximas plasmáticas de $5,2$ - $5,8 \mu\text{g/ml}$ a 1 hora después de dosificar. Con inyecciones intramusculares y subcutáneas se alcanzaron C_{max} de $2,7$ - $4,7$ y $1,25$ - $1,8 \mu\text{g/ml}$, respectivamente, entre las 2 y 8 horas después de la administración (Hjerpe, 1979). En otro estudio las C_{max} en suero de tilosina aparecieron a las 5-6 horas después de la inyección intramuscular en ganado, con una biodisponibilidad sistémica del 70-80% de la dosis administrada (Ziv y Sulman, 1973b; Baggot, 1978). La absorción de tilosina base después de inyección intramuscular fue del 17% y 94% de la dosis administrada a las 7 y 24 horas, respectivamente (Nouws y Ziv, 1977a).

En un estudio cruzado, se reportó una biodisponibilidad relativa de Tylan® 200 Inyectable cuando se administró subcutáneamente e intramuscularmente a ganado vacuno. Se aplicó $17,6 \text{ mg/kg p.c.}$ de Tylan® 200 Inyectable subcutánea o intramuscularmente a dos grupos compuestos por 6 animales de cada sexo durante 5 días consecutivos. En las muestras de suero se analizó la actividad antimicrobiana de la tilosina, el límite de cuantificación (LOQ) del método analítico era aproximadamente de $0,1 \text{ mg/l}$. Después de la administración subcutánea, la tilosina se absorbió más lentamente y alcanzó una C_{max} de $0,89 \text{ mg/l}$, aproximadamente la mitad de lo obtenido después de la administración intramuscular (C_{max} de $1,80 \text{ mg/l}$). El tiempo para alcanzar la concentración máxima (T_{max}) fue de 1 hora para la administración intramuscular y de 4,1 horas para la subcutánea, y la semivida $t_{1/2e}$ fue de 6,9 y 16,2 horas, respectivamente. La biodisponibilidad de la tilosina después de la administración

subcutánea fue del 113% respecto a la de la administración intramuscular (Kiorpes, 1993).

En un estudio llevado a cabo en terneros se determinaron las concentraciones en plasma sanguíneo después de la administración intravenosa (10 mg/kg p.c.) y vía oral por sonda gástrica (20 mg/kg p.c. dos veces al día durante 5 días) por LC-MS/MS (el LOQ del método analítico fue de 5 µg/kg). Después de la dosis intravenosa se identificaron los siguientes parámetros farmacocinéticos: $C_0 = 16,9 \mu\text{g/ml}$; $V_{ss} = 3,49 \text{ l/kg}$; $Cl_b = 23 \text{ ml/min/kg}$; $AUC_{0-24h} = 7,4 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ y $t_{1/2e} = 10,9 \text{ horas}$. La biodisponibilidad oral de la tilosina en agua es muy baja, alrededor del 1,7%. En el mismo estudio, en ganado vacuno se evaluó la cinética de tilosina en plasma después de una única dosis intravenosa de 10 mg/kg p.c. y administraciones intramusculares durante 3 días consecutivos de 10 mg/kg p.c/día. Los parámetros farmacocinéticos analizados para la dosis intravenosa fueron los siguientes: $C_0 = 31,3 \mu\text{g/ml}$; $V_{ss} = 2,01 \text{ l/kg}$; $Cl_b = 10 \text{ ml/min/kg}$; $AUC_{0-\infty} = 16,8 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ y $t_{1/2e} = 12,7 \text{ horas}$. Los parámetros farmacocinéticos analizados para la dosis intramuscular final fueron: $C_{max} = 2,1 \mu\text{g/ml}$; $T_{max} = 2,6 \text{ horas}$; $t_{1/2e} = 16,6 \text{ horas}$; y $AUC_{0-\infty} = 18,4 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$. La biodisponibilidad de la tilosina después de la administración intramuscular fue del 110% respecto a la administración intravenosa (Abdul-Karim, 2006a).

Se ha estudiado la administración de tilosina base en una única administración intravenosa o intramuscular a ganado a una dosis de 4,6-7,3 mg/kg p.c. (Nouws y Ziv, 1977b; Nouws y Zig, 1979). Las concentraciones de tilosina en bilis fueron de 59,1 µg/ml (intravenosa) y 56,3 µg/ml (intramuscular) a las 7 horas después de la inyección; 35,1 µg/ml (intramuscular) a las 24 horas; y 12,1 µg/ml (intramuscular) a las 31 horas. La razón concentración bilis/suero fue de 296:1 (intravenosa) y 62:1 (intramuscular) a las 7 horas tras la inyección; 100:1 (intramuscular) a las 24 horas tras la inyección y 48:1 (intramuscular) a las 31 horas tras la inyección. Las proporciones fueron mucho más bajas que aquellas descritas para perros, 1230-3780:1 (WHO, 1991). En el estudio de ganado, las concentraciones de tilosina en orina fueron 29,7 µg/ml (intravenosa) y 41,7 µg/ml (intramuscular) 7 horas después de la administración; 12,9 µg/ml (intramuscular) 24 horas después y 17,7 µg/ml (intramuscular) 31 horas después de la inyección (Nouws y Ziv, 1977b; Nouws y Ziv, 1979).

En el caso de terneros jóvenes entre 44-59 kg p.c. se les inyectó 10 mg/kg de Tylan 200 vía subcutánea e intramuscular. Los resultados fueron muy similares para ambas rutas en cuanto al porcentaje de absorción, T_{max} y $t_{1/2e}$ entre las dos rutas (Thomson, undated-a). A otro grupo de terneros de aproximadamente 60 kg p.c. se les administró una dosis de 10 mg tilosina/kg p.c., vía subcutánea e intramuscular, en forma de tilosina tartrato en agua, tilosina tartrato en propilenglicol y agua, y tilosina base en propilenglicol y agua (Tylan 200 inyectable). Otro grupo de terneros recibieron la misma dosis de Tylan 200 inyectable intravenoso. Los resultados fueron que la absorción de las formulaciones que contenían tilosina tartrato fue más rápida después de la administración vía subcutánea e intramuscular que la absorción de la formulación que contenía tilosina base (Thomson, undated-b).

Ovinos

En un estudio de ovinos se usaron 12 ovejas macho sanas, de 9-12 meses de edad con pesos entre 30-35 kg. Se les administró una única dosis de 1g/kg p.c. de tilosina intramuscular en el músculo cervical. Se recogieron muestras de sangre a diferentes tiempos: 0 (justo antes del tratamiento), 15 minutos, 30 minutos, 75 minutos, 1 hora, 6 horas, 24 horas, 96 horas, 168 horas y 240 horas después de la administración. Se separó el plasma por centrifugación y se congelaron para posterior análisis. La C_{max} fue de 198 $\mu\text{g/ml}$ en plasma (Shaddad *et al.*, 2007), mucho más alta que la obtenida después inyección intramuscular en cabras (C_{max} 2,38 $\mu\text{g/ml}$) (Atef *et al.*, 1991) y en camellos (1,16 $\mu\text{g/ml}$) después de administración intravenosa (Ziv *et al.*, 1995). La diferencia en los valores de C_{max} se puede atribuir a que son diferentes niveles de dosificación y diferentes especies. El tiempo para alcanzar esta concentración, T_{max} 0,93 h (Shaddad *et al.*, 2007), fue más corto que el descrito en la cabra (4,19 h) después de la administración intramuscular (Atef *et al.*, 1991). Las concentraciones del fármaco en plasma revelan un descenso biexponencial, el cual se podría describir por el modelo de dos compartimentos abiertos (Baggot 1977; Burrow 1980, 1983, 1986; Shaddad *et al.*, 2007). La $t_{1/2e}$ 2 h (Shaddad *et al.*, 2007), fue más alta que la alcanzada en cabras (0,2 h) (Atef *et al.*, 1991), pero similar a la reportada en camellos (3 h) (Ziv *et al.*, 1995). Los volúmenes de distribución (V_d) son altos lo que indica una amplia distribución del fármaco (Shaddad *et al.*, 2007, Atef *et al.*, 1991; Parts *et al.*, 2002b; Duthu, 1985; Modric *et al.*, 1998), lo que indica una amplia distribución del fármaco. El

aclaramiento total o clearance del fármaco es del orden de 511,7 ml/h y el tiempo medio de permanencia de 30 h (Shaddad *et al.*, 2007).

Taha *et al.* (1999), hicieron un estudio comparativo de los parámetros cinéticos en ovejas y cabras. Para ello utilizaron 5 cabras de 12-15 kg y 14-16 meses de edad y 5 ovejas de 16-20 kg y 10-12 meses de edad. Todos eran machos con buen estado de salud. Se le administró una dosis de 15 mg/kg intravenosa. Después de 2 semanas los animales recibieron la misma dosis intramuscularmente. Se recogieron muestras de sangre a diferentes intervalos a los 5, 10, 20, 40, 60, 90 minutos, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas después de la administración intramuscular y a los 0, 15, 30, 45 minutos y 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 24 horas después de la inyección intramuscular. Se separó el plasma por centrifugación y se conservó a -20°C para posterior análisis. (Taha *et al.*, 1999). Las concentraciones de tilosina en plasma se determinaron por ensayo microbiológico con el procedimiento difusión en agar de acuerdo a Bennet *et al.* (1966). Las concentraciones plasmáticas vs intervalos de tiempo después de la administración intravenosa en ovejas y cabras se ajustan a un modelo abierto bicompartimental (Taha *et al.*, 1999), lo que sigue la misma línea que las observaciones realizadas previamente en ganado vacuno (Baggot y Gingerich, 1976; Burrows *et al.*, 1983), cabras (Atef *et al.*, 1991) y camellos (Ziv *et al.*, 1995). Los Vd de la tilosina después de la administración intravenosa no fueron significativamente diferentes entre ovejas y cabras ($3,12 \pm 0,34$ y $2,74 \pm 0,56$ l/kg, respectivamente), indicando una amplia distribución del fármaco, lo que implica altas concentraciones en tejidos (Taha *et al.*, 1999). Los valores obtenidos para ambas especies fueron más altos que los reportados previamente para cabras (Atef *et al.*, 1991) y ganado vacuno (Baggot y Gingerich, 1976; Burrows *et al.*, 1983, 1986). Sin embargo, el volumen de distribución en estado estacionario (Vss) fue similar para ambas especies, siendo significativamente menor que el valor de $11,93 \pm 5,88$ l/kg en camellos (Ziv *et al.*, 1995). En cuanto a la semivida de eliminación no hubo diferencias significativas entre ovejas y cabras ($285,28 \pm 42,51$ y $254,51 \pm 19,22$ min, respectivamente). Sin embargo, los valores en ambas especies fueron más elevados que los descritos en cabras (182,4 min) (Atef *et al.*, 1991), terneros (73,3 min) (Burrows *et al.*, 1986), vacas (97,2 min) (Baggot y Gingerich, 1976) y camellos (55,0 min) (Ziv *et al.*, 1995). El aclaramiento total o clearance en ovejas fue similar al obtenido para cabras por Atef *et al.* (1991) ($6,8 \pm 0,1$ ml/min/kg), y los valores observados entre ovejas y cabras ($6,89 \pm 0,94$ y $8,66 \pm 1,37$ ml/min/kg,

respectivamente) no fueron significativamente diferentes de los valores observados en vacas (Baggot y Gingerich, 1976), pero fueron sustancialmente más bajos que los reportados para terneros ($23,70 \pm 0,96$ ml/min/kg) (Burrows *et al.*, 1986) y camellos (Ziv *et al.*, 1995). Después de la administración intramuscular, el comportamiento cinético de la tilosina fue similar en ambas especies, es más, la semivida de eliminación después de la administración intramuscular en ambas especies fue similar a la obtenida por la ruta intravenosa. La semivida de eliminación y la biodisponibilidad en ovejas y cabras fue similar a la descrita en camellos (Ziv *et al.*, 1995). La alta biodisponibilidad en las 2 especies indica la alta absorción del fármaco cuando se administra intramuscular. Sin embargo, hay un mayor volumen en el compartimento central y un aclaramiento mayor significativo en cabras que en ovejas después de la inyección intravenosa (Taha *et al.*, 1999).

Cerdos

Cuando se administró tilosina tartrato a cerdos por vía oral a dosis de 30 mg/kg p.c., se detectó actividad de tilosina en plasma a los 10 minutos de dosificar, con una concentración máxima de 2,4 µg/ml aproximadamente a las 1,5 h después. Comparando las AUC en sangre después de la administración intravenosa y oral se obtuvo una biodisponibilidad estimada del 22,5%. Cuando la tilosina se administra como fosfato granulado oralmente a cerdos a dosis de 110 mg/kg p.c., la actividad de la tilosina en suero alcanza la Cmax una hora después de dosificar (alrededor de 17,8 µg/ml) y no se detecta después de 24 horas de dosificar ($< 0,1$ µg/ml). Se obtuvieron resultados similares después de la administración oral de fosfato de tilosina en agua a dosis de 50 mg/kg p.c. Se detectaron concentraciones de tilosina en suero desde los 10 minutos hasta las 8 horas después de dosificar con una Cmax de 8,5 µg/ml a la hora de dosificar (WHO, 1991). Los resultados de un estudio comparativo de residuos en cerdos sugieren que la absorción del fosfato de tilosina desde el tracto gastrointestinal es comparable a la del tartrato de tilosina (Iritani *et al.*, 1975).

Después de la administración intramuscular a cerdos con tilosina base en 50% de propilenglicol, o con una solución acuosa de sal de tartrato a dosis de 2,5-5 mg/kg p.c., la concentración máxima en sangre de tilosina se alcanzó en un Tmax de 0,5-2 h. Sin embargo, los resultados demostraron que la actividad de la tilosina persiste en sangre durante casi 4 horas en el caso de la tilosina base y 8 horas con la sal de tartrato (Sauter

et al., 1962). Cuando los cerdos recibieron la tilosina base a dosis de 10 mg/kg p.c. por inyección intramuscular, la Cmax en plasma de tilosina (0.4-1.9 µg/ml) se alcanzó en un Tmax de 0.3-3 h y la biodisponibilidad fue del 95% (Prats *et al.*, 2002b). Después de una única inyección intramuscular en cerdos con una mezcla comercial de tilosina y florfenicol (FTD-inj®) a dosis de 2.5 ó 10 mg/kg p.c. (tilosina) y dosis de 5 ó 20 mg/kg p.c. (florfenicol), la Cmax de tilosina fue 1.3 µg/ml a las 2,4 h para la dosis baja y de 2,7 µg/ml a las 2,57 h para la dosis alta. La semivida de eliminación ($t_{1/2e}$) fue de 3,9 h y 3 h para la dosis baja y alta, respectivamente (Kim *et al.*, 2008).

Se midieron los niveles de tilosina en suero y tejido pulmonar en cerdos después de una única dosis intramuscular de 17,6 mg/kg p.c. de Tylan® 50. La tilosina se absorbió rápidamente produciendo concentraciones medibles en suero y pulmón dentro de las 2 horas después de la inyección. Se observaron Cmax de 14 mg/kg y 2.0 µg/ml en pulmón y suero, respectivamente, a las 4 horas tras la dosificación. No se detectó tilosina en suero después de 12-24 horas, pero persistió en pulmón durante 48 horas (van Duyn y Johnson, undated). En un experimento similar, la tilosina se midió en suero y tejido pulmonar en cerdos después de la administración de una única inyección intramuscular de Tylan® 50 a dosis de 8,8 mg/kg. Las Cmax de tilosina aparecieron a las 2 horas después de la dosificación (5,7 mg/kg en pulmón y 2 µg/ml en suero). La tilosina se detectó en suero durante menos de 12 horas y en tejido pulmonar durante 36-48 horas (Van Duyn, undated).

En un estudio en el cual se administró 110 mg/kg p.c. de tilosina fosfato oralmente a cerdos, se midió la actividad de la tilosina en muestras de sangre que se fueron tomando hasta las 24 horas después de dosificar. La actividad en suero alcanzó su Cmax una hora después de dosificar (17,81 mg/l); 24 horas después de dosificar la tilosina no era detectable (<0,1 mg/l) (Van Duyn y Kline, undated-c).

En otro estudio de comparación de concentraciones de tilosina en pulmón y suero, se inyectó a cerdos Tylan® 200 intramuscularmente a dosis de 10 mg/kg p.c. durante 5 días consecutivos. La actividad de los residuos de la tilosina se determinó en suero y tejido pulmonar por ensayo microbiológico. La Cmax en suero (1,7 µg/ml) ocurrió a las 2 horas después de dosificar y disminuyó a 0,6 y 0,4 µg/ml a las 4 y 6 horas, respectivamente. No se detectó actividad en las muestras de suero a las 12 y 72 h después de dosificar. La Cmax de tilosina en pulmón apareció (5,8 mg/kg) a las 2 horas

después de la administración. La actividad de la tilosina en pulmón disminuyó por debajo del LOQ de 0,1 mg/kg a las 12 y 72 horas (Cochrane y Thomson, 1990).

Pratts *et al.* (2002a) obtuvieron valores de Cl_b de 26,8 ml/min/kg y de V_d de 16,6 l/kg después de una única administración intravenosa de tilosina en cerdos sanos. Estos autores también reportaron que la $t_{1/2}$ de tilosina excedía las 24 horas cuando la tilosina base se administraba intramuscularmente en cerdos a dosis de 10 mg/kg p.c.

Aves

En un estudio realizado en pollos broiler de 720 g de peso se les administró una dosis única de 50 mg de tilosina tartrato, mediante intubación estomacal, detectándose una actividad de la tilosina en suero después de media hora. Las concentraciones máximas (C_{max}) en suero fueron de 0,6-4 µg/ml a las 2 horas de la administración y fueron indetectables pasadas 24 horas. Después de la administración oral a pollos de 2 kg de 50 mg tilosina, a las 1, 2 y 3 horas, las concentraciones máximas (C_{max}) en suero fueron de 0,3 µg/ml detectadas a las 4 horas después de la última dosis y a las 24 horas ya no se podía detectar niveles de tilosina en suero (WHO, 1991). Se obtuvieron resultados parecidos en pollos que recibieron una dosis única oral de 10 mg/kg p.c. de tilosina tartrato, observándose una concentración máxima (C_{max}) en plasma de 1,2 µg/ml a las 1,5 horas después de la administración de tilosina. La biodisponibilidad oral de la tilosina fue del 30-40% (Kowalski *et al.*, 2002). Pollos que fueron medicados en el agua de bebida con tilosina a dosis de 500 y 700 mg/l durante 48 horas tuvieron unas concentraciones medias de tilosina en suero de 0,12 y 0,17 µg/ml, respectivamente. En este estudio, las concentraciones máximas (C_{max}) fueron de 0,2-0,3 µg/ml después de 24 horas (Ziv, 1980).

En un estudio de bioequivalencia oral, se analizaron dos productos comerciales que contenían tilosina tartrato, comparando las concentraciones de tilosina en suero en pollos broilers de 5 y 7 semanas de edad y gallinas ponedoras de 9 meses de edad. Se dosificó el agua de bebida con tilosina tartrato a 750 mg/l durante 5 días. La media de las concentraciones de tilosina en suero fue aproximadamente de 0,2 µg/ml para los dos productos comerciales (Ziv y Risenberg, 1991). A diferencia de los resultados obtenidos en cerdos (Iritani *et al.*, 1975), la tilosina fosfato no se absorbió con el mismo grado como la tilosina tartrato desde el tracto digestivo en pollos. No se detectó tilosina en

sangre o músculo de pollos alimentados durante 8 semanas con pienso con tilosina fosfato a dosis de 1500 mg/kg (Yoshida *et al.*, 1973).

Lacoste (2003) realizó un estudio de farmacocinética en pollos broiler, a los cuales administró tilosina A intravenosamente y vía oral por sonda gástrica como solución acuosa a dosis de 25 mg tilosina/kg p.c. de Tylan® Soluble, y vía oral por sonda como pienso a dosis de 25 mg tilosina/kg p.c. de Tylan® Premix, siendo dosis recomendadas para pollos. El análisis farmacocinético de las concentraciones-tiempo en plasma para la administración intravenosa dio valores de AUC de 7,1 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ y de AUMC de 35,8 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$. El tiempo medio de residencia (MRT) fue aproximadamente de 5 horas. En la primera fase la $t_{1/2\alpha}$ calculada fue de 1,6 h; en la segunda fase la $t_{1/2\beta}$ calculada fue 1,26 h, y la eliminación terminal (tercera fase) la $t_{1/2\gamma}$ fue de 35 h. En el análisis farmacocinético de la curva concentración plasmática-tiempo tras la administración oral de tilosina se obtuvieron los siguientes valores: $C_{\text{max}} = 0,4 \text{ g/ml}$, $T_{\text{max}} = 2 \text{ horas}$ (Tylan® soluble) y $C_{\text{max}} = 0,2 \text{ g/ml}$, $T_{\text{max}} = 2 \text{ horas}$ (Tylan® Premix). La biodisponibilidad oral absoluta calculada a partir del AUC total fue de aproximadamente el 11% para Tylan® soluble y aproximadamente el 7% para Tylan® Premix.

En otro estudio en pollos (Abdul-Karim, 2006b), se les administró 10 mg/kg p.c. intravenosamente, 74 mg/kg p.c./día vía oral en el agua de bebida y 92,5 mg/kg p.c./día vía oral como premezcla, obteniéndose parámetros farmacocinéticos parecidos a los analizados por Lacoste (2003). La biodisponibilidad de la tilosina disuelta en agua y en la premezcla de pienso fue del 3 y 8% respectivamente. Con la dosis intravenosa, la concentración de plasma inicial (C_0) fue de 8,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el aclaramiento o clearance (Cl_b) fue de 136 ml/min/kg y el V_{ss} de 8,6 l/kg.

Kowalski y Pomorska (2006) estudiaron las concentraciones de tilosina en plasma en 74 pollos broilers por un método analítico de HPLC. La C_{max} a las 3 horas (en polvo y líquido) después de la administración oral, fue de 403,20 ng/ml y 403,12 ng/ml, respectivamente. Los perfiles de tilosina en plasma después de la administración de ambas formulaciones fueron similares.

Conejos

En un estudio realizado en conejos, se les administró tilosina a dosis de 10 mg/kg p.c. intramuscular. Se tomaron muestras de sangre a las 1,5; 4; 7 y 24 horas después del tratamiento y se midió la actividad de la tilosina. La C_{max} se alcanzó en un T_{max} de 15 h ($\leq 0,88$ $\mu\text{g/ml}$). A otros dos grupos de animales se les aplicó intramuscularmente tartrato de tilosina a dosis de 10 y 25 mg/kg p.c. Se les recogió muestras de sangre a la 1, 2, 4 6 y 24 horas después del tratamiento para evaluar la concentración de tilosina. Las C_{max} en suero se encontraron a un T_{max} de 1 hora después del tratamiento en los dos grupos ($\leq 1,4$ y $\leq 7,2$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente). En todos los animales, la concentración estuvo por debajo de los límites de detección (0,5 $\mu\text{g/ml}$) a las 6-7 horas (Anderson, 1960; Anderson *et al.*, 1966b).

Se puede resumir que la biodisponibilidad oral de la tilosina en ratas, perros y ganado vacuno es baja. En cerdos, la biodisponibilidad oral es alrededor de un 22,5% mayor. En la mayoría de las especies, la C_{max} se alcanza a las 1-2 horas después de la administración (≤ 1 mg/l en rata después de 50 mg/kg p.c., $\leq 0,9$ mg/l en conejo después de 10 mg/kg p.c. y ≤ 3 mg/kg p.c. en perro después de 25 mg/kg p.c.) (EMEA, 1997).

En la Tabla 5 se muestra la biodisponibilidad de la tilosina en diferentes especies animales.

Tabla 5. Biodisponibilidad de la tilosina en diferentes especies animales.

Espece	Vía de administración	Biodisponibilidad (%)	Referencia
Cerdos	oral	22.5	EMEA, 1997
	oral	25	Iritani <i>et al.</i> , 1975
	intramuscular	95	Prats <i>et al.</i> , 2002b
Pollos	oral	30-40	Kowalski <i>et al.</i> , 2002
	intravenosa	11	Lacoste, 2003
	oral	7	Lacoste, 2003
	oral	3-8	Abdul-Karim, 2006b
Vacas	oral	1.7	Abdul-Karim, 2006a
	intramuscular	70-80	Ziv y Sulman, 1973b; Baggot, 1978

Distribución

Los antibióticos administrados parentalmente se distribuyen por el cuerpo a través de la sangre y difunden a los tejidos diana para provocar efectos sistémicos y alcanzar tejidos no diana tales como las glándulas mamarias. Las concentraciones de fármaco alcanzadas en los diferentes tejidos dependen de la capacidad del fármaco para penetrar el endotelio capilar y difundirse a través de las membranas biológicas de naturaleza lipídica (Baggot, 1977).

En el caso de los macrólidos, estos difunden a través de la membrana debido a su carácter lipofílico y probablemente por la existencia de un transporte activo dependiente del calcio, alcanzando concentraciones en el citoplasma varias veces superior a las séricas (Kirst y Sides, 1983). Sin embargo, los macrólidos difunden escasamente a través de las meninges (concentración en el LCR < 10% de la sérica). En general pasan a la saliva, a las secreciones bronquiales y a la leche materna, donde alcanzan concentraciones mayores al 50% de la sérica, pero no difunden a los tejidos fetales (Neu, 1991). Debido a la afinidad de los macrólidos por los leucocitos, logran alcanzar concentraciones elevadas en el foco infeccioso muy por encima de las CMI para los microorganismos patógenos (Zhanel *et al.*, 2001; Drusano, 2001).

La tilosina, como macrólido que es, y debido a su naturaleza de base orgánica, unido moderadamente a proteínas séricas (40%), con un alto grado de liposolubilidad (Hamill *et al.*, 1961), es de esperar que se distribuya ampliamente por los fluidos y tejidos corporales alcanzando concentraciones en tejidos que superan a los niveles en plasma ((Baggot, 1974; Baggot y Gingerich, 1976)

Ganado vacuno

En general, las bases débiles lipofílicas como la tilosina, pasan rápidamente del plasma a la leche, la cual tiene un pH inferior al plasma. Esto ha sido confirmado en varios experimentos en diferentes especies de rumiantes. Por ejemplo, en vacas que recibieron una única inyección intravenosa de tartrato de tilosina a una dosis de 20 mg/kg p.c., se observaron valores de concentración de tilosina en leche (alrededor de 10 µg/ml) a las 4 horas después de la inyección; correspondientes a unas concentraciones de tilosina en plasma de 3,5 µg/ml. Se observaron valores de concentración de tilosina en leche más bajos, alrededor de 6 µg/ml, 6 horas después de una única inyección

intramuscular de tartrato de tilosina a la misma dosis. Cuando la tilosina base se administró a vacas intramuscularmente a dosis de 12,5 mg/kg p.c. cada 12 horas durante 48 horas, la concentración máxima de tilosina en leche fue de 7 µg/ml después de 60 horas de la administración y disminuyó rápidamente a 1,5 µg/ml a las 72 horas. La razón concentración leche/suero estuvieron alrededor de 20:1 (Gingerich *et al.*, 1977). Se observaron similares ratios de concentración leche/suero (17,5:1) en vacas después de una única infusión intramamaria de 200 mg de tilosina/cuarto. Cuando vacas mastíticas recibieron inyecciones intramusculares repetidas de tilosina base a dosis de 10 mg/kg p.c. cada 12 horas durante 5 días, las concentraciones de tilosina en leche incrementaron de modo constante hasta 18 µg/ml en el 5 día después del inicio de la terapia (El-Sayed *et al.*, 1986).

Los ratios de la concentración tejido/plasma reportados son de 2.05:1 en vacas y 2.5:1 en cabras (Baggot y Gingerich, 1976; Atef *et al.*, 1991). En vacas el Vd analizado fue de 1.1-2.27 l/kg (Ziv y Sulman, 1973b; Baggot y Gingerich, 1976; Gingerich *et al.*, 1977; Cester *et al.*, 1993), siendo similar en ovejas y cabras. Sin embargo, los valores para terneros jóvenes de Vd son más altos, 2,48-5,68 l/kg (Burrows *et al.*, 1983; Burrows *et al.*, 1986).

En otro experimento se administró tilosina intramuscularmente a vacas a dosis de 6,8-7,3 mg/kg p.c. Los ratios de las concentraciones tejido:suero se midieron 7-31 horas después del tratamiento y fueron de 35,2:1 en corteza renal, 13,9:1 en médula renal y 5,7:1 en hígado. A las 24 horas, las concentraciones de tilosina fueron de 35 µg/ml en bilis, 13 µg/ml en orina, < 0,4 µg/ml en plasma y < 0,4 mg/kg en músculo (Nouws y Ziv, 1977b; Nouws y Ziv, 1979). Cuando terneros de menos de 3 semanas de edad recibieron una única dosis intramuscular de tilosina base a 17,6 mg/kg p.c., las concentraciones de tilosina en pulmón durante 24 horas después de dosificar alcanzaron los 4,5 hasta los 15,7 mg/kg con un ratio AUC_{48h} pulmón:AUC_{48h} plasma de 16,6:1 (van Duyn y Folkerts, 1979). Se administró tilosina base a dosis de 10 mg/kg p.c. por inyección intramuscular cada 12 horas en 3 ocasiones a 6 terneros de 6 semanas de edad con neumonía. Los ratios de las concentraciones de tilosina tejido:suero medidas dos horas después de la última dosis fueron de 2:1 para pulmón neumónico, 1,6:1 pulmón no neumónico, 2,1:1 para hígado y 2,6:1 para riñón. La concentración más alta de

tilosina, alrededor de 3,3 mg/kg, se encontró en riñón, mientras que la más baja, < 0,5 mg/kg, fue en músculo y fluido cerebrospinal (Burrows *et al.*, 1986).

Saurit *et al.* (2002) compararon la farmacocinética de la tilosina en ganado vacuno (*Bos Taurus*) y búfalos (*Bubalus bubalis*). Seis animales recibieron una única dosis de 10 mg/kg de tilosina tartrato por vía intramuscular. Las concentraciones séricas y el Vd presentaron diferencias entre las 2 especies: Cmax búfalos $0,40 \pm 0,046$ µg/ml y vacuno $0,64 \pm 0,068$ µg/ml; Vd búfalos $1,91 \pm 0,12$ l/kg y vacuno $1,33 \pm 0,09$ l/kg. Como los parámetros farmacocinéticos no difieren considerablemente se recomienda usar el mismo régimen de dosificación para ambas especies. Después de la administración intramuscular, la tilosina se detectó en plasma entre los 5 min y las 12 horas en ambas especies. La absorción fue más rápida en búfalos que en vacuno. No hubo diferencias entre las dos especies en cuanto a la velocidad de eliminación, vidas medias, área bajo la curva, áreas bajo el momento de la curva, la media del tiempo de permanencia y los aclaramientos. La velocidad de absorción de tilosina, valorada como Tmax para vacuno y búfalos no difirió significativamente, aunque la Cmax fue un 40% más alta en vacuno que en búfalos. Los valores de Cmax obtenidos en este estudio fueron más bajos que los obtenidos en otros rumiantes, por ejemplo en vacas (Baggot y Gingerich, 1976), cabras y ovejas (Atef *et al.*, 1991; Taha *et al.*, 1999). La diferencia puede deberse al uso de diferentes preparaciones comerciales. Sin embargo los resultados obtenidos relativos a la eliminación (Saurit *et al.*, 2002) fueron consistentes con los obtenidos en vacas y terneros (Baggot y Gingerich, 1976; Burrows *et al.*, 1986), pero sustancialmente más bajos que los descritos para terneros (Burrows *et al.*, 1986) y camellos (Ziv *et al.*, 1995). Las diferencias significativas en los volúmenes de distribución para vacuno y búfalos indican una amplia distribución del fármaco incluyendo grandes concentraciones en tejidos (Saurit *et al.*, 2002). Los valores obtenidos para ambas especies son más altos que los que se habían descrito previamente para vacuno (Baggot y Gingerich, 1976; Burrows *et al.*, 1983). Sin embargo, fueron significativamente más bajos que para camellos (Ziv *et al.*, 1995). La prolongada semivida de eliminación en vacuno y búfalos indica una liberación continua de fármaco desde el sitio de inyección o desde los tejidos que sirven de reservorio del fármaco (Saurit *et al.*, 2002), un fenómeno característico de los antibióticos macrólidos (Burrows, 1980).

El alto Vd y la larga semivida de eliminación en vacuno y búfalos muestran un amplio nivel de penetración y retención tisular de tilosina en ambas especies. Estos resultados están acordes con las observaciones reportadas en vacuno (Gingerich *et al.*, 1977; Burrows, 1980), cabras (Atef *et al.*, 1991) y camellos (Ziv *et al.*, 1995). Las diferencias se pueden atribuir al mayor tejido subcutáneo en búfalos comparado con las vacas y a la presencia de una joroba que contiene abundante tejido adiposo en búfalos. Las concentraciones plasmáticas en vacuno y búfalos fueron más altas que la media de los valores de la CMI necesarias para muchos organismos sensibles. Además, las concentraciones máximas se alcanzaron entre los 30 minutos y 2 horas, y los niveles terapéuticos se mantuvieron durante varias horas (Saurit *et al.*, 2002).

De un estudio de la tilosina después de la administración intravenosa a 6 vacas, se advierte que la distribución no fue completa hasta dos horas después de la inyección. La semivida de eliminación en suero fue de $1,62 \pm 0,17$ horas. El volumen de distribución fue de $1,10 + 0,45$ l/kg (Gingerich *et al.*, 1997). Los valores calculados en este estudio para la semivida de eliminación y Vd estuvieron dentro del mismo rango que los valores previamente descritos (Ziv y Sulman, 1973b). El alto Vd sugiere que la tilosina, como otras bases orgánicas liposolubles, se distribuye ampliamente por tejidos y otros fluidos además del suero (Baggot, 1974). La curva de depleción de las concentraciones de suero después de la administración intramuscular indica que el fármaco no se absorbe ampliamente como previamente se había sugerido (Sauter *et al.*, 1962). Las concentraciones de suero alcanzaron la Cmax a diferentes tiempos (con un rango entre 90 minutos y 4 horas). Se detectaron concentraciones de tilosina 24 horas después de la inyección intramuscular en cada una de las 6 vacas. Los bajos pero persistentes niveles de tilosina reflejan una baja absorción y una rápida eliminación. La tilosina se detectó en leche dentro de los 15 minutos después de la inyección en la única vaca lactante tratada intravenosamente. La concentración del fármaco en leche excedió la concentración en suero a los 90 minutos y permaneció 5 veces más alta en todo el periodo de muestreo. El pH de la leche en esta vaca permaneció estable en 6,6. (Gingerich *et al.*, 1997). La detección de tilosina en leche después de la administración intravenosa sugiere que la tilosina pasa rápidamente a leche por difusión pasiva no iónica (Zig y Sulman, 1973b). La tilosina ($pK_a = 7,1$) está 67% no ionizada en suero con pH de 7,4, mientras que sólo el 20% está no ionizada al pH normal de la leche de 6,5. Mientras que la fracción no ionizada es difusible, la difusión pasiva del suero a

leche es favorecida sobre la difusión de leche a suero. Bajo condiciones de equilibrio, se predice una proporción leche:suero de 4,8:1 para leche no mastítica de pH 6,5. En la misma medida, se han medido y predicho proporciones leche:suero más bajas para leche mastítica de pH más elevado (Ziv y Sulman, 1973b).

Después de la administración intramuscular en tres vacas lactantes, se detectó tilosina a las dos horas. La concentración de tilosina en leche excedió su concentración en suero en todos los tiempos de muestreo. El pH de la leche estuvo entre 6,5 y 6,8. Se detectaron concentraciones de tilosina (media de 1,49 µg/ml) en leche 24 horas después de la última inyección en las 3 vacas. Las altas concentraciones de tilosina en leche después de múltiples inyecciones intramusculares apoyan la teoría de la difusión pasiva no iónica. Las proporciones leche:suero estimadas por diferencia de unión a proteínas y calculadas en varios tiempos estaban alrededor de 20:1 (Gingerich *et al.*, 1997). Se midió la actividad de la tilosina. Se descubrió que la actividad antimicrobiana de la tilosina era dependiente del pH. La tilosina se vuelve progresivamente más activa a medida que el pH del medio se ajusta entre 6 y 8 (McGuire *et al.*, 1961). Diferencias en la concentración de tilosina en leche y suero puede reflejar diferencias en la actividad antimicrobiana debido al pH así como diferencias en las concentraciones actuales de fármaco debido a los diferentes grados de ionización (Gingerich *et al.*, 1997).

Pollos

La distribución en pollos comparado con otras especies es generalmente más baja, estableciéndose un Vd de 0,69 l/kg. La $t_{1/2e}$ de tilosina en plasma después de una única administración intravenosa en pollos sanos fue de 0,5 horas (Kowalski *et al.*, 2002). Cuando pollos de 5-7 semanas de edad recibieron dosis de 100 o 250 mg tilosina tartrato/kg p.c. vía oral, las concentraciones máximas de tilosina en orina fueron < 00 µg/ml y >1400 µg/ml respectivamente, después de 2-4 horas de dosificar. Las concentraciones de tilosina en orina disminuyeron rápidamente después (FAO/WHO, 1991).

Metabolismo

Con excepción de la azitromicina, todos los macrólidos se metabolizan en el hígado y sufren un efecto de primer paso que puede disminuir de manera significativa su biodisponibilidad (Carbon, 1998).

Ratas

Las rutas de biotransformación principales de la tilosina son reducción, O-demetilación en la fracción micaminosa, N-demetilación de la micaminosa sustituyente y una combinación de reducción y N-demetilación. Aproximadamente el 98% de los residuos metabólicos en ratas se excretan por heces, constando de los siguientes metabolitos (expresados como un % total de ^{14}C -residuos): tilosina D (10%), tilosina A (6%), y tilosina C y dihidrodesmicosina (DDM; 4%); en el perfil metabólico de rata no se identificó tilosina B. Sólo el 1% de los residuos metabólicos de tilosina se excretan por orina en ratas (Sieck *et al.*, 1978a).

Se dosificó a 344 Ratas Fischer por sonda oral con 10 mg ^{14}C -tilosina/kg p.c. una vez al día durante 4 días (Kennington y Donoho, 1994). A las 4 horas después de la última dosis las ratas fueron sacrificadas y se recogió el hígado y riñón para análisis. La media de los residuos en riñón era de 90 μg de tilosina equivalentes/kg. El análisis reveló la presencia de múltiples metabolitos, incluyendo tilosina A, tilosina D y dihidrodesmicosina. Incluso, existían evidencias de la presencia de residuos de cisteinil-tilosina A en hígado. En otro estudio con 8 ratas, alrededor del 95% de la radioactividad se excretó por heces. Los compuestos radioactivos principales fueron tilosina D y DDM. También se detectaron niveles bajos de tilosina C, tilosina A, tilosina D y desmetil-dihidrodesmicosina (Kennington y Donoho, 1994).

Eliminación

Los macrólidos se eliminan principalmente por vía biliar en forma de metabolitos y de producto activo, siendo la concentración biliar superior a la sérica. La eliminación urinaria de todos los macrólidos es inferior al 10%, excepto para la claritromicina (Lode *et al.*, 1993).

Ganado vacuno

Se estudió la excreción de la tilosina después de una administración intramuscular de ^{14}C -tilosina a dosis de 17,6 mg/kg p.c. al día durante 3 días a dos terneros Holstein

de 150 kg de peso aproximadamente (Kennington *et al.*, 1994a). Se les sacrificó 4 horas después de la última dosis registrándose una excreción en heces y orina del 48% de la radioactividad administrada. Aproximadamente el 20% de la radioactividad excretada se detectó en orina y el 80% en heces. En los extracto fecales se encontró tilosina A (30%), tilosina C (25%), tilosina D (11%) y desmetil-tilosina D, mientras que el 70% de la radioactividad recogida en orina fue cisteinil-tilosina A (Kennington *et al.*, 1994a).

La tilosina se elimina rápidamente de la sangre en ganado, con un Cl_b entre 23,7-42,2 ml/min/kg en terneros y 7,4-8,7 ml/min/kg en vacas; $t_{1/2}$ después de una única administración intravenosa entre 1-2,4 horas en terneros y 1,6-2,8 en vacas. En el caso de la administración intramuscular los valores de $t_{1/2}$ fueron un poco más altos, 2,2-3,2 h (Lewicki, 2006).

Cerdos

En un estudio realizado en cerdos que recibieron tilosina radiomarcada (¹⁴C-tilosina), se detectó que el 99% de los residuos metabólicos se excretaron por heces y el 1% por orina. Los principales componentes de esos residuos fueron descritos como tilosina D (33%), dihidrodesmicosina (8%) y tilosina A (6%). Además, se aislaron al menos 10 metabolitos menores de tilosina que representan el 5% o menos del total de residuos excretados. En el perfil metabólico no se identificó tilosina B (FAO/WHO, 1991). Kennington *et al.* (1994b) dosificaron a tres cerdos con ¹⁴C-tilosina a dosis de 220 mg/kg en pienso durante 5 días, obteniendo como resultado que aproximadamente el 94% de la radioactividad fue excretada por heces y el 6% por orina. La tilosina D y la dihidrodesmicosina supusieron el 43% y 44%, respectivamente, del total de radioactividad en heces, en dos de los tres cerdos. Las heces del tercer cerdo contenían como principal componente tilosina D, aproximadamente el 56% y tilosina D como un menor componente, aproximadamente el 6%.

Ovejas

En el caso de las ovejas lactantes la curva de concentración plasmática-tiempo se ajusta al modelo de monocompartimental abierto (Al Wabel, 2008). Este modelo también ha sido descrito por otros autores que describen la farmacocinética de los macrólidos en diferentes especies animales, como cabras (Atef *et al.*, 1991) y ganado vacuno y búfalos (Saurit *et al.*, 2002).

Al Wabel (2008) detectó tilosina en plasma a los 15 minutos, pero no pudo detectar tilosina en plasma 10 horas después de la inyección intramuscular. La concentración de tilosina en leche fue más alta que en plasma, detectándose dentro de los 30 minutos tras la inyección una cantidad de 0,4 µg/ml, la cual se aumentó gradualmente hasta alcanzar una C_{max} de 11 µg/ml en un T_{max} de 6 horas, lo cual refleja una rápida absorción de la tilosina después de ser administrada intramuscularmente. Asimismo, se encontraron niveles residuales medibles en leche en todos los animales pasadas las 72 horas post tratamiento. Se calculó un AUC de 3 µg/ml y una C_{max} de 0,63 µg/ml con un T_{max} de 1,3 h. Esta C_{max} es cercana a la observada por Saurit *et al.* (2002) en ganado vacuno (0,64 µg/ml) y está en relación con lo observado para tilmicosina en ovejas con una C_{max} en plasma y leche de 1,36 y 10,25 µg/ml, respectivamente (Parker *et al.*, 1994). Sin embargo, este valor es más bajo que el descrito en cerdos (1 µg/ml) (Prats *et al.*, 2002a), pollos (1,2 µg/ml) (Kowalski *et al.*, 2002) y cabras (2,38 µg/ml) (Atef *et al.*, 1991). La semivida de eliminación (t_{1/2e}) en plasma fue de 2,3 h y el tiempo medio de residencia (MRT) fue de 3,9 h (Al Wabel, 2008). La t_{1/2e} es mucho más baja que las observadas en cerdos (24 h) (Prats *et al.*, 2002b) y para tilmicosina en ovejas lactantes (15,4 h) (Atef *et al.*, 1999). Esta variación se puede atribuir a las diferencias anatómicas y fisiológicas entre las diferentes especies animales (Al Wabel, 2008).

La tilosina se elimina lentamente de la leche como indica sus prolongados t_{1/2e} (3,3 h) y MRT (7,83 h). Las ratios C_{max} leche/C_{max} plasma y AUC leche/AUC plasma fueron de 11,8 y 29,5 respectivamente. Estos elevados valores indican una preferencia en la penetración de la tilosina desde el flujo sanguíneo a la glándula mamaria de las ovejas lactantes después de la administración intramuscular. La unión proteica de la tilosina *in vitro* fue de 19,3% en plasma y 30,2% en leche, siendo claro que la afinidad de la unión proteica está inversamente relacionada con las concentraciones de fármaco (Al Wabel, 2008).

El grado de ionización del fármaco en leche y plasma, su liposolubilidad y el grado en el cual el fármaco se une a las proteínas de la leche o el plasma determina su concentración en leche y en sangre (Ziv y Sulman, 1973a). En general sólo las moléculas liposolubles no ionizadas y sin unir a proteínas son las que alcanzan la glándulas mamarias y se excretan por la leche (Al Wabel, 2008). Debido a que la

tilosina es una molécula orgánica básica altamente liposoluble ($pK_a = 7,1$) con una unión del 30% a las proteínas de la leche y presenta un grado bajo de ionización (Gingerich *et al.*, 1977) se distribuye a la ubre y leche (Al Wabel, 2008). Se ha descrito un mecanismo similar con la espiramicina como antibiótico macrólido en leche (Nouws y Ziv, 1980). Se determinó que la capacidad de la tilosina para unirse a las proteínas del plasma y leche en ovejas fue de 19,3 y 30,2% respectivamente, lo cual concuerda con lo estudiado para la tilmicosina en ovejas donde la unión de la tilmicosina fue de 16,8% en plasma y 26,8% en leche (Atef *et al.*, 1999). La mayor unión a las proteínas lácticas que a las del plasma en todos los fármacos estudiados se debe a la caseína de la leche, pues es el componente con mayor unión (Stebler y Guentert, 1990). El amplio rango de valores se puede deber a los diferentes métodos usados para determinar la afinidad proteica. No se detectaron concentraciones de tilosina en leche después de 72 horas post inyección.

En rata y perro se ha descrito secreción biliar significativa después de la administración parenteral con ratios de concentración bilis/suero entre 143-266 y 1230-3780 después de dosis de 100 mg/kg p.c. intraperitoneal y 10 mg/kg p.c. intravenosa respectivamente (Anderson, 1960; Anderson *et al.*, 1966b). Después de la administración oral diaria en ratas de 10 mg/kg p.c. de tilosina durante 3 días, seguida de la administración de ^{14}C -tilosina durante 5 días, el 99% de la radiactividad fue excretada por heces y el 1% por orina. Los residuos excretados consistían principalmente en tilosina factor D (10%), tilosina A (6%) y dihidrodesmicosina (4%) (Sieck *et al.*, 1978). Otro estudio realizado en cerdos, se les administró 110 mg/kg p.c. de tilosina oralmente durante 2 semanas, seguido de ^{14}C -tilosina durante 3 días; el 99% de la radioactividad se excretó por heces y el 1% por orina, la mayoría de los residuos fueron tilosina factor D (33%), tilosina factor A (6%) y dihidrodesmicosina. Resultados similares se obtuvieron en un estudio en cerdos, en este estudio alrededor del 94% de la radiactividad se excretó por heces y el 6% por orina. El 43% de la radioactividad en heces era tilosina factor D y el 44% dihidrodesmicosina. También se encontraron residuos del factor D de tilosina y dihidrodesmicosina en hígado y riñón. En un estudio en terneros, después de inyectar intramuscularmente 17,6 mg/kg p.c. de ^{14}C -tilosina, menos del 50% de la dosis administrada se recuperó en heces, detectándose 29,8% de tilosina A, 11,4% de tilosina factor D, 25,2% de tilosina factor C y 10,8% de dimetil-tilosina factor D, mientras que en orina el mayor componente encontrado (70%) fue la

cisteinil-tilosina A. En conclusión la tilosina se metabolizó por rutas metabólicas parecidas en ratas, cerdos y ganado bovino, existiendo diferencias cuantitativas en las cantidades de metabolitos producidos (EMEA, 1997).

En resumen muchos estudios farmacocinéticos se han llevado a cabo con tilosina en diferentes especies animales. La tilosina se absorbe rápidamente del tracto alimentario. Tras administración oral, las concentraciones plasmáticas máximas aparecen tras 1-4 horas, aunque la biodisponibilidad es moderada (20-40%). Tras administración intramuscular, las concentraciones plasmáticas máximas se observan tras 2-6 horas, con una biodisponibilidad del 70-95%. La tilosina se distribuye bien en los tejidos, la razón tejido/plasma suele ser 2, y los volúmenes de distribución son superiores a 1 l/kg. La tilosina se elimina rápidamente del plasma sanguíneo en las diversas especies de animales estudiadas, con una semivida de eliminación tras administración intravenosa de 0,4-4,5 horas. La mayor eliminación plasmática de la tilosina se ha observado en roedores (clearance > 70 ml/min/kg) y la más baja en vacuno y ovinos (clearance > 10 ml/min/kg). Existe relación entre el clearance de tilosina y el peso corporal de los animales. Aunque la tilosina es ampliamente metabolizada, no se ha encontrado ningún metabolito a concentraciones superiores de las del compuesto padre. El compuesto padre, tilosin A, se ha considerado el único residuo marcador (EMEA, 1997).

En la Tabla 6 se presentan diversos parámetros farmacocinéticos de la tilosina en diferentes especies animales.

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de la tilosina en especies animales

Animal	Ruta y dosis (mg/kg)	Unión a proteínas (%)	Concentración máxima - C _{max} (µg/ml)	Tiempo para alcanzar la concentración máxima - T _{max} (h)	Biodisponibilidad F (%)	Vida media de eliminación - T _{1/2} eL (h)	Aclaramiento total - Cl _B (ml/min/kg)	Volumen de distribución - V _d (l/kg)	Referencia
Rata	i.v., 25					0.4	86	2.2	Duthu, 1985
	v.o., 50 ^a		≤ 1	1-2					van Leeuwen <i>et al.</i> , 1991
	i.g., 20-100 ^a		~ 0.5-1.1	2					Kietzmann, 1985
Conejo	i.m., 10 ^a		0.57-0.88	1.5					van Leeuwen <i>et al.</i> , 1991
	i.m., 25 ^b		4.7-7.2	1					
Perro	i.v., 10 ^a		~ 1.5	0.5		0.9	21.9	1.7	Weisel <i>et al.</i> , 1977
	i.m., 10 ^a					2.4		proporción tejido:plasma - 0.68	
	v.o., 25 ^a		1.4-2.7	2					van Leeuwen <i>et al.</i> , 1991
	v.o., 100 ^a		2.7-4.6	2-5					
Vaca	i.v., 12.5 ^a					1.62	7.8	1.1 proporción tejido:plasma - 2.05	Baggot and Gingerich, 1976
	i.v., 20 ^b	33.5-44				2.14		1.56	Ziv and Sulman, 1972; 1973b
	i.m., 20 ^b		~ 2.5	5					
	i.v., 12.5 ^a					1.62		1.1	Gingerich <i>et al.</i> , 1977
	i.m., 12.5 ^a		<1	1.5-4					Baggot, 1978
	i.m., 12.5 ^a		0.85	6	70-80				El-Sayed <i>et al.</i> , 1986
	i.m., 10 ^a		5.83 ^d	0.75 ^d		3.02 ^d	5.46 ^d		Cester <i>et al.</i> , 1993
	i.v., 10 ^a					2.77 ^e	7.43 ^e	1.84 ^e	
Ternero	i.v., 10 ^a					2.84 ^f	8.78 ^f	2.27 ^f	Burrows <i>et al.</i> , 1983
						2.32 ^g	24.5 ^g	4.4 ^g	
						0.95 ^h	42.2 ^h	3.52 ^h	
						1.53 ⁱ	37.0 ⁱ	5.68 ⁱ	
	i.v., 10 ^a					1.22 ⁱ	23.7 ⁱ	2.48 ^j	Burrows <i>et al.</i> , 1986
						0.84 ^{ij}	26.4 ^{ij}	1.91 ^{ij}	
			2.7-4.7	2					
			1.25-1.8	8					
Búfalo	i.t., 25 ^a		5.2-5.8	1					Hjerpe, 1979
	i.m., 10 ^b		0.65	1.05		2.24			
	i.m., 10 ^b		0.47	0.85		2.40			
Oveja	i.v., 20 ^b		38-45.4			2.05		1.59	Ziv and Sulman, 1972; 1973b
	i.m., 20 ^b		~ 2.5	4					
	i.v., 15 ^b					4.75	6.89	2.74	
	i.m., 15 ^b		2.58	3.29	73				
Cabra	i.v., 15 ^b					4.24	8.66	3.12	Taha <i>et al.</i> , 1999
	i.m., 15 ^b		2.08	3.84	84				
	i.v., 15 ^b	37.6	2.4	4	72.6	3.04	6.8	1.7	
	i.m., 15 ^b							proporción tejido:plasma - 2.5	
Camello	i.v., 10 ^b	38.6-47.7				0.92	239.28	11.93	Ziv <i>et al.</i> , 1995
	i.m., 20 ^b	26.8-45.8 ^k				1.52 ^k	39.73 ^k	3.88 ^k	
			1.16	~ 0.5	88	3.71			
Cerdo	i.v., 10 ^c		1.0			4.52	26.8	14.6	Prats <i>et al.</i> , 2002a
	i.m., 10 ^a			1.5	95	24.49			
Pollo	i.v., 10 ^b	30				0.52	5.3	0.69	Kowalski <i>et al.</i> , 2002
	v.o., 10 ^b		1.2	1.5	30.7-334	2.07			

Nota: i.v. - intravenosa; i.m.- intramuscular; s.c. - subcutánea; v.o. - oral; i.g. - intragástrica; i.t. - intratraqueal; a - tilosina base; b - tilosina tartrato; c - tilosina fosfato; d - vacas con mastitis; e - vacas en estro; f - vacas en fase lútea; g - terneros recién nacidos (dos días); h - terneros de 2 semanas de edad; i - terneros de 6 semanas de edad; j - terneros con neumonía; k - camellos privados de agua

2.4. Toxicidad

Los efectos adversos causados por macrólidos aparecen después de 10 a 20 días de tratamiento iniciando con náuseas, vómitos y dolores abdominales y posteriormente ictericia con alteración de las pruebas de función hepática. La hepatotoxicidad es la reacción adversa más temida causada por los macrólidos, sin embargo, es poco frecuente. Se produce una hepatitis colestática caracterizada histológicamente por estasis biliar, infiltración periportal y necrosis hepática.

Además de la toxicidad hepática pueden producirse reacciones ototóxicas con el uso de macrólidos relacionadas con la administración intravenosa, la aplicación de dosis elevadas o el uso en pacientes con insuficiencia hepática o renal (Williams y Sefton, 1993; González *et al.*, 1998).

Otro problema frecuente en el uso de todos los macrólidos es la severa irritación tisular cuando se administra mediante inyección, provocando dolor e inflamación. Dentro del grupo de estos antibióticos la eritromicina es el que causa mayor dolor e irritación (Giguère, 2006).

2.4.1. Toxicidad aguda

En la mayoría de los estudios realizados se maneja un periodo de observación de 7 días después de la administración de la dosis, pero no se especifica el sexo del roedor. Este periodo de observación es menor que el actualmente requerido por las directrices regulatorias, el cual es de 14 días. Además la mayoría de estos resultados solo están disponibles a manera de resumen (Roberts *et al.*, 2009). En la Tabla 7 se relacionan algunos de estos resultados.

En el caso concreto de la tilosina, tanto la tilosina base como sus sales han demostrado poseer baja toxicidad cuando se administran vía oral, con valores de DL_{50} superiores a 5000 mg/kg p.c. en rata y ratón y mayores a 800 mg/kg p.c. en perros. Estudios comparativos intravenosos de tilosina, desmicosina y macrosina en ratas hembras dieron valores de DL_{50} de 312, 193 y 189 mg/kg p.c., respectivamente. En los tres casos se observó temores, convulsiones clónicas y debilidad de extremidades, con disminución del acicalamiento en animales dosificados con tilosina e hipoactividad y ataxia en aquellos dosificados con desmicosina. Sin embargo el peso corporal no se vio

afectado (Quarles, 1983). En perros, se observaron signos claros de toxicidad, incluyendo salivación, emesis y diarrea (EMEA, 1997).

El tratamiento intraperitoneal en ratón con tilosina base provocó vocalización y agresividad, lo cual sugiere irritación y dolor. La muerte de los animales fue precedida de depresión y postración. En perros las dosis altas de tilosina base causaron salivación, vómito y defecación (Anderson *et al.*, 1966a).

En ratón se estudió la toxicidad aguda de la desmicosina. La DL_{50} para la vía oral, subcutánea e intraperitoneal fue de >5000, 1593 y 483 mg/kg p.c., respectivamente. Para el caso de las sales de tartrato de desmicosina en las vías de administración oral, subcutánea e intravenosa los valores de la DL_{50} fueron >5000, 1706 y 323 mg/kg p.c., respectivamente (Morton, 1988).

En otro estudio, se administró a gallos, divididos en grupos de 10 animales, una dosis única de tilosina fosfato, a unos de forma oral y otros por inyección subcutánea. La DL_{50} obtenida fue de 3765 mg/kg p.c. para la vía oral y 501 mg/kg p.c. para la vía subcutánea (Richards y Berkman, undated).

En otro estudio con codornices, se les dividió en grupos de 5 animales por sexo, se les administró una dosis única de tilosina base a dosis de 0, 1000 o 2000 mg/kg p.c. Ningún animal murió pero sí tuvieron diarrea transitoria (Kehr *et al.*, 1978a).

Tabla 7. Toxicidad aguda de la tilosina

Especie	Vía administración	DL50 (mg/kg b.w)	Formulación	CL50 (mg/l)	Formulación	Referencia
Rata	Oral	> 500	Tilosina con un 26.7% de tilosina base como fosfato			Gries <i>et al.</i> (1985a)
		> 0.5	Tylan 200 inyectable	> 1.05	Tylan 200 inyectable 1.05 mg/litro/h	Gries <i>et al.</i> (1985b)
		> 6200	Tilosina fosfato			Anderson y Worth (undated)
		> 5000	Tilosina base			
		> 6200	Tilosina tartrato			
	Intraperitoneal	1001	Tilosina fosfato			Gries <i>et al.</i> (1985c)
		> 2500	Tilosina tartrato			
	Intravenosa	695	Tilosina tartrato			
	Subcutánea	4083	Tilosina fosfato			Gries <i>et al.</i> (1985c)
		> 3000	Tilosina tartrato			
	Inhalatoria			1 hora > 0.6	Tylan soluble 0.6 mg/litro	
Ratón	Oral	> 6200	Tilosina fosfato			Anderson y Worth (undated)
		> 5000	Tilosina base			
		> 6200	Tilosina tartrato			
	Intraperitoneal	492.5	Tilosina fosfato			
		594.1	Tilosina base			
	Subcutánea	1354	Tilosina tartrato			Gries <i>et al.</i> (1983)
		784.1	Tilosina fosfato			
		> 2500	Tilosina base			
	Intravenosa	385,7	Tilosina fosfato			
		581,7	Tilosina clorhidrato			
		588,8	Tilosina lactato			
		588,9	Tilosina tartrato			
	Intravenosa	aprox 321	20 mg tilosina/ml			
Conejo	Dérmica	> 2000	Tilosina con un 26.7% de tilosina base como fosfato			Gries <i>et al.</i> (1985a)
		> 2000	Tilosina tartrato			Gries <i>et al.</i> (1985c)
		> 2,0	Tylan 200 inyectable			Gries <i>et al.</i> (1985b)
Perro	Oral	> 800	Tilosina base			Anderson y Worth (undated)

2.4.2. Toxicidad subcrónica

Existen también diversos ensayos en los que se estudia la toxicidad subcrónica. En el caso de estudios en ratas se les administró de forma subcutánea dosis de tilosina base a 10, 25, 50 o 100 mg/kg p.c./día durante 28 días. No hubo diferencia entre los grupos en lo referente a la ingesta de alimento y la ganancia de peso corporal, y el recuento celular en sangre estuvo dentro de los parámetros normales. El examen macroscópico y microscópico de corazón, hígado, riñón, pulmón, ovario, útero, estómago, intestino, timo, páncreas, tiroides y glándulas salivares y adrenales no reveló ninguna anomalía (Anderson *et al.*, 1966a,b).

En otro estudio las dosis administradas fueron de 0, 100, 250, 500 y 1000 mg de tilosina tartrato por kg de p.c. al día durante 28 días. Durante la primera semana los animales que recibieron las dosis de 250, 550 y 1000 mg/kg/p.c. presentaron diarrea y en general las heces fueron de consistencia blanda en todos los niveles de dosificación. El resto de los exámenes (sangre, órganos) estuvieron dentro de los parámetros normales (Anderson *et al.*, 1966a,b).

A otro grupo de 12 animales se les administró por sonda 0; 0,005; 0,2; 10 y 200 mg de tilosina base por kg p.c. al día durante 6 semanas. En este caso la diarrea solo se evidenció en los animales del grupo tratado con 200 mg/kg p.c. Terminando el estudio se presentaron ligeros cambios en el aumento de volumen plaquetario, disminución de recuento de glóbulos blancos y monocitos en todas las dosis. En el caso de las hembras tratadas con la dosis más alta se vieron incrementados los valores séricos de la ALT (alanino aminotransferasa) y la bilirrubina total, mientras que la lactato deshidrogenasa, FSH (hormona folículo estimulante) y la prolactina disminuyeron en las dosis de 0,2 y 200 mg/kg p.c. En los machos tratados con dosis de 10 y 200 mg/kg disminuyeron los valores de ALT y aumentaron los de testosterona, en el caso de los de 200 mg/kg p.c. aumentó la motilidad espermática, sin embargo el recuento espermático disminuyó sin encontrar en este caso relación con la dosis. En los animales con 0,2; 10 y 200 mg/kg p.c. disminuyeron las inmunoglobulinas G y M (Jeong *et al.*, 2007).

También se han realizado ensayos en perros. En este caso se administró tilosina base en cápsulas durante 30 días a dosis de 25 y 200 mg/kg p.c. Los hallazgos encontrados fueron hematuria, albuminuria y cistitis. En otro estudio se administró 25 mg de tilosina base/kg p.c. en cápsulas 2 veces al día durante 25 días. En este caso casi

no hubo hallazgos fuera de lo esperado, solo ligeramente aumentada la albúmina en orina (Anderson *et al.*, 1966a,b).

Existen diversos estudios de dosis múltiple con tilosina en ratas y perros, pero la mayoría se realizaron hace tiempo y sin los estándares actuales. En ratas expuestas a dosis subcutáneas diarias de 10-100 mg tilosina/kg p.c. en una suspensión de goma arábica durante un mes, no se reportaron efectos relacionados con el tratamiento. En otro estudio de un mes en ratas, se expusieron a dosis de 100-1000 mg/kg p.c. de tilosina como tartrato de sal, usando la misma ruta y vehículo. En este caso se observó diarrea con dosis mayores o iguales a 250 mg/kg durante la primera semana, pasando a deposiciones suaves. En las tratadas con dosis de 100 mg/kg se advirtió lo mismo, aunque de forma esporádica. Con todas las dosis se observó cicatrización y formación de costras en el sitio de inyección de modo ocasional. Dosis orales de 200 mg/kg p.c. y superiores de tilosina provocaron vómito y diarrea en perros en un estudio de dos años. Se vieron efectos renales leves (nefrosis y pielonefritis) en 1 de los 4 perros a dosis de 200 mg/kg p.c. y en otro a dosis de 400 mg/kg p.c. El NOAEL fue de 100 mg/kg p.c. por día (EMEA, 1997).

En otro estudio se administró tilosina base a polluelos de codorniz 0, 1250, 2500 y 5000 mg/kg durante 5 días en el pienso, seguido de 3 días de dieta basal. En este caso no se relacionaron efectos relacionados con el tratamiento. En otras aves, en este caso patos se administró tilosina base durante 5 días a las mismas dosis y después también 3 días de dieta basal. Tampoco hubo signos de toxicidad ni muertes. Hubo una disminución en la ganancia de peso, pero se asume al rechazo del alimento no por el tratamiento (Kehr *et al.*, 1978b,c).

Berkman y Van Duyn (undated) ensayaron tilosina tartrato en pollos durante 18 semanas no encontrando ninguna diferencia entre los animales tratados y el grupo control. En otro también de pollos se administró tilosina tartrato a dosis de 0; 0,5 y 1,5 g/l de agua de bebida durante 8 días tampoco se reportaron cambios debido al tratamiento ni en otro estudio realizado con pavos a dosis de 0; 0,5 y 1,5 g tilosina tartrato/l en agua de bebida por 5 días y con cerdos a 0; 0,25 y 0,75 g tilosina tartrato/l en el agua de bebida durante 10 días (Cameron, 1990a,b,c).

En terneros se administró la tilosina tartrato en el sustituto de la leche a dosis de 0; 1 y 3 g/por ternero durante 14 días. En este caso el único síntoma detectado fueron

heces duras y secas durante la segunda semana del experimento en los dos grupos tratados (Cameron, 1990d).

2.4.3. Toxicidad crónica

Broddle y colaboradores (1978a) realizaron un ensayo en 15 ratas hembras administrando en la pienso tilosina base durante un año a dosis de 0, 1000, 5000 y 10000 mg/kg de alimento. Durante el estudio los animales se mostraron irritables e hiperactivos a partir del séptimo mes de tratamiento, pero no hubo mortalidad atribuible al medicamento. Sí hubo un aumento significativo en el número de linfocitos y del pH urinario, y un descenso de neutrófilos en las dos dosis más elevadas. Al realizar el examen microscópico se observó un ligero incremento de tumores pituitarios en todas las dosis. Como la incidencia de tumores no estaba relacionada con la dosis, se consideró un NOAEL de 1000 mg/kg pienso, equivalente a 39 mg/kg p.c./día.

En otros estudios con ratas lo que se observó fue disminución del tamaño y peso de los ovarios, aumento en el espesor y peso del útero y metaplasia escamosa en útero. Aunque los autores relacionan más estos efectos con la edad que con el tratamiento. En un ensayo con dosis elevadas (0, 20000, 50000, 100000 y 200000 mg tilosina base/kg) en la dieta de ratas durante 2 años se observó una reducción en la ganancia de peso y en la ingesta de alimento en las 2 dosis más altas. Con la dosis más altas todos los animales murieron durante los primeros 12 meses y mostraron malnutrición y atrofia o necrosis de órganos linfoides (Anderson *et al.*, 1966a,b).

Se ha demostrado una alta correlación entre tumores benignos de pituitaria en ratas machos y el consumo de alimento y el peso corporal. Los tumores pituitarios son comunes en ratas de avanzada edad. El aumento de adenomas pituitarios no se considera directamente relacionado con la tilosina, pero sí debido a que el uso de tilosina incrementa el consumo de alimento y la supervivencia (Ross *et al.*, 1970; Gries, 1980; Gries y Young, 1982). Se estableció un NOAEL fue de 10000 mg/kg pienso, equivalente a 402 mg/kg p.c./día, la dosis utilizada más elevada.

En un estudio en perros se les administró tilosina base a dosis de 0, 1, 10 y 100 mg/kg p.c./día en forma de cápsula durante 2 años. A los 153 días del estudio se incorporaron nuevos animales a los que se administró dosis de 200 y 400 mg/kg p.c./día

de tilosina base. Los perros tratados con dosis de 10 y 400 mg/kg p.c. sufrieron vómitos y diarrea ocasional. Unos de los hallazgos en algunos animales se encontró una ligera pielonefritis, nefrosis bilateral y leve cistitis crónica en los animales tratados con dosis más elevadas. Como la diarrea y los vómitos también fueron comunes en los animales control, el NOAEL fue de 100 mg/kg p.c./día (Anderson *et al.*, 1966a).

Se llevó a cabo un estudio de un año en ratas destetadas de madres alimentadas con dietas que contenían tilosina. Las crías se expusieron a dietas que contenían 0; 0,1; 0,5 y 1% de tilosina base (equivalente aproximadamente a 0, 50, 500 y 1000 mg/kg p.c. al día). No se relacionaron con el tratamiento efectos sobre la ganancia de peso, el consumo de alimento, el peso de los órganos o algún tipo de patología. Hubo un incremento dosis-relacionado en el conteo linfocitario y un correspondiente descenso de neutrófilos en ambos sexos, significativo sólo en el 0,5% de los machos y en 1% de las hembras. La glucosa sérica se aumentó en la dosis más alta (significativo sólo en hembras) y la orina se hizo más alcalina en la dosis intermedia y alta en hembras. El NOAEL fue de 0,1% equivalente o aproximado a 50 mg/kg p.c. (EMEA, 1997).

2.4.4. Otros estudios toxicológicos

Se estudió la genotoxicidad de la tilosina en 3 ensayos *in vitro* y uno *in vivo* (Kindig, 1990; Michaelis, 1990; Garriott *et al.*, 1991). Se obtuvieron resultados débiles sólo en ausencia de activación metabólica y en niveles de dosis citotóxicas cuando la tilosina se administró en un rango de concentraciones de 10-1000 µg/ml en dimetil-sulfoxido (DMSO), en una muestra de linfoma L5178YTK^{+/-} de ratón *in vitro* para ensayar mutación génica. Sin embargo, no se observó aumento en la frecuencia de mutación en un ensayo de mutación genética *in vitro* en el locus HGPRT⁺ en células ováricas de hámster chino usando concentraciones de 100-1500 µg/ml. La tilosina no se consideró mutagénica en un ensayo de aberración cromosómica *in vitro* en el que se usaron células ováricas de hámster chino a dosis de 500-1000 µg/ml en dimetil-sulfoxido, con o sin activación metabólica. También resultó negativo un ensayo *in vivo* en micronucleos de médula ósea de ratón (dos dosis diarias de 1250-5000 mg de tilosina base/kg p.c. en goma arábica) (Gries *et al.*, 1990). En general, se concluye que es poco probable que la tilosina presente un riesgo mutagénico (EMEA, 1997).

En cuanto a carcinogenicidad se replicaron dos estudios en ratas Wistar. Las crías F1 de animales alimentados con tilosina durante 10 semanas antes de aparearse fueron alimentadas con dietas que contenían 0; 0,1; 0,5 y 1% de tilosina durante 2 años (equivalente o aproximado a 0, 50, 500 o 1000 mg/kg al día). No se vieron en la hematología, análisis clínicos o urianálisis efectos relacionados con el tratamiento. Existió tendencia hacia un aumento en la supervivencia, ganancia de peso y consumo de alimentos en los machos tratados comparados con los controles. El aumento de supervivencia en los grupos tratados se asoció a una disminución en neumonía necrotizante relacionada con el tratamiento. No se reportaron efectos en el peso de los órganos relacionados con el tratamiento. En machos, se vio un incremento dosis dependiente en adenomas pituitarios, en el 10% de los controles, 11% de los de dosis baja, 22,5% en dosis intermedia y en el 25% de la dosis alta. La incidencia en tumores malignos no se vio afectada por el tratamiento. Existen datos históricos de controles sobre la incidencia de adenomas pituitarios en 13 estudios de dos años en la misma estirpe de rata. Estos datos indican una incidencia inusualmente baja de adenomas pituitarios en los controles de los estudios de tilosina. Se demostró una asociación entre la incidencia de adenomas pituitarios con el peso corporal, concluyendo que el aparente incremento en la incidencia de adenomas pituitarios en los grupos tratados con tilosina, es más atribuible al aumento de supervivencia y de peso corporal en esos grupos que al efecto carcinogénico de la sustancia (EMEA, 1997). Se han descrito los efectos de dosis bajas de tilosina (0,1 y 0,5 mg/kg pienso en la dieta durante más de 65 días) sobre el eje pituitario-gonadal de machos de ratas Wistar. Se observaron cambios estadísticamente significantes en algunos niveles de hormonas y en los pesos de la pituitaria, sin embargo, no hubo evidencia de relación con el tiempo o la dosis. Asimismo, existen ciertas inconsistencias en la metodología y la interpretación de resultados, por lo que no resulta clara la evidencia del efecto directo de la tilosina en eje pituitario-gonadal (EMEA, 1997).

Existen estudios crónicos más antiguos en ratas, con grupos de 3 a 30 animales/sexo/grupo, expuesto a dietas que contenían más del 20% de tilosina base durante 17 meses a 2 años. No se reportaron efectos significativos relacionados con el tratamiento, sin embargo los estudios y reportes eran inadecuados para el establecimiento de riesgos carcinogénicos (EMEA, 1997).

En cuanto a los estudios de toxicidad reproductiva no mostraron indicios de ningún efecto adverso en los parámetros reproductivos, tales como la fertilidad. Aunque hay que decir que no fueron llevados a cabo bajo estándares modernos y existen pocas referencias publicadas. En un estudio de 2 generaciones en ratón, se expuso a los animales a dietas que contenían 0; 0,1 ó 1% de tilosina y no se obtuvieron efectos en los parámetros reproductivos relacionados con el tratamiento. En otro estudio de 3 generaciones en ratas se les dio 0 ó 1% de tilosina base, no observándose efectos relacionados con el tratamiento. En un estudio especial desarrollado en ratas destetadas recibieron dietas que contenían 0; 0,1; 0,5 y 1% de tilosina base (equivalente aproximadamente a 0, 1000, 5000 y 10000 mg/kg pienso) durante 10 semanas antes de aparearse y durante 6 meses después. A los machos que se les dio la dosis más alta demostraron al final del estudio un descenso en el recuento de glóbulos blancos. Las crías no se vieron afectadas por el tratamiento (Tsubura *et al.*, undated; Harris, 1961; Broddle *et al.*, 1978b; Hoyt y Higdon, 1991; EMEA, 1997).

En un estudio de teratogenicidad en ratones gestantes se les dio dosis de 0, 100, 500 y 1000 mg/kg de tilosina en agua por sonda oral en los días 7-12 de la gestación. Se sacrificaron el día 18 sin reporte de efectos en los parámetros reproductivos o fetales. Se observó a las crías durante 9 semanas después del nacimiento y se examinó su crecimiento, supervivencia, comportamiento y morfología, no observándose efectos. En dos estudios, las ratas gestantes se expusieron a dietas con dosis de 0; 0,1; 1 y 10% de tilosina en los días 1-20 de gestación (equivalente a 0; 60,5; 725 y 4800 mg/kg p.c. al día). En el primer estudio las crías se sacrificaron el día 20 de gestación, reportándose únicamente efectos adversos leves, como una pequeña disminución del peso de las crías y retraso en la osificación con la dosis más elevada (4800 mg/kg pc.). No se presentaron efectos a la dosis intermedia de 725 mg/kg p.c., la cual se estableció como NOAEL. En el segundo estudio se observó a las crías durante el destete, encontrándose una ligera disminución en el crecimiento sólo en la dosis más alta (Tsuchikawa y Akabori, undated; Terashima y Maeda, undated; Kelich y Byrd, 1991; EMEA, 1997).

También se estudiaron los efectos de la tilosina sobre la presión sanguínea, actividad cardíaca, motilidad institucional y respiración. En este caso el estudio se hizo con perros a los que se administró clorhidrato de tilosina intravenosamente a dosis de 10-40 mg/kg p.c. Después de la administración se produjo una disminución de la

presión arterial, entre un 13 y un 40% en función de la dosis administrada. En algunos casos este efecto fue transitorio, pero en otros duró más de 1 hora. En algunos animales se produjo un ligero incremento de la frecuencia respiratoria. La motilidad intestinal también se vio incrementada. Sólo en un animal que recibió la dosis más alta el electrocardiograma mostró un incremento en la altura de las ondas T y S (Anderson, 1960; Anderson *et al.*, 1966a).

En el caso de estudios sobre neurotoxicidad se administró tilosina tartrato a dosis de 200 mg/kg p.c. durante 90 días a 4 gatos. Se evidenció una ligera reducción en la respuesta del nistagmo rotatorio. La audición se mantuvo intacta y tampoco se manifestó ataxia, lo que concluyó en no hubo indicación alguna de neurotoxicidad (Anderson *et al.*, 1966a).

Se estudió la absorción y acumulación celular en cultivos de macrófagos alveolares de cerdo y bovino usando tilosina radiomarcada. La concentración más alta se alcanzó a las 24 h de la incubación celular con teniendo una media de 20 µg/ml de antibiótico. La proporción de la concentración intracelular/extracelular de tilosina fue de 9,8 y 6,1 para cerdo y bovino respectivamente (Chamberland, 1993).

Se realizaron estudios de sensibilidad en cobayas usando 10 mg de tilosina base por vía subcutánea, y 2-10 mg de tilosina HCL/kg p.c. intraperitoneal, seguido de una dosis intravenosa de 5 mg/kg p.c., indicando que se produjo la muerte con todas las dosis excepto con 2 mg/kg p.c., considerándose estos estudios inadecuados para evaluar el potencial de sensibilización. Se advirtió que la tilosina tartrato produjo una leve reacción sensitiva en cobayas a los 14 días después de exponerlas a 10 inyecciones intradérmicas de 50 mg/ml. En un estudio sueco 6 de cada 9 cirujanos veterinarios con dermatitis de contacto fueron sensibles a tilosina, existiendo casos de dermatitis de contacto en personas que trabajan con animales (Veien *et al.*, 1980; Verbov, 1983; EMEA, 1997). Estos resultados sugieren que en humanos la tilosina podría causar irritación y/o dermatitis alérgica (Roberts *et al.*, 2009)

También se evaluó la sensibilidad dérmica en gatos y perros a los que administró tilosina intramuscularmente a dosis de 11 mg/kg p.c., no encontrándose ninguna lesión, ni irritación interna o externa en el sitio de inyección (Van Duyn y Kline, undated-d).

Las formulaciones con tilosina estudiadas causaron leve irritación dérmica y ocular en conejo. En conejos se aplicó tópicamente en la piel. Después de 24 h de exposición, se lavó el sitio de aplicación y se observaron los animales durante 14 días más. No hubo muertes relacionadas con el tratamiento ni signos de toxicidad sistémica. Si hubo una ligera irritación dérmica y descamación. Cuando se administró en ojo, se observó una ligera hiperemia conjuntival que desapareció en 48 h. También se observó opacidad corneal y una moderada iritis y conjuntivitis a la hora de la exposición. Toda irritación desapareció a los 14 días (Downs y Negilski, 1985a,b; Negilski y Downs, 1985).

La tilosina nunca ha sido usada en medicina humana. En un estudio humano voluntario, se administró una dosis oral diaria de 20 mg de tilosina durante un periodo de 6 meses, obteniéndose sólo un efecto marginal en el número de estreptococos resistentes (Malin y Sillicker, 1966). Esta tendencia hacia aumentar la resistencia no se observó en otro estudio los voluntarios recibieron dosis orales de 0.2 y 5 mg de tilosina al día durante 3 meses (Kuwabara, undated). No se observaron efectos adversos en ningún estudio. Se consideró que de esos datos limitados no se puede basar una IDA microbiológica (EMEA, 1997).

De 3812 cepas humanas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Campylobacter* spp. aisladas entre 1985 y 1987, solo se mostraron resistentes a tilosina el 1%. No hay evidencias que estas cepas resistentes provengan de fuente animal (Lacey, 1987).

Se calculó una IDA toxicológica de 500 µg/mg p.c. aplicando un factor de seguridad de 100 al NOAEL de 50 mg/kg p.c. que fue establecido en un estudio en ratas de dosis repetidas en la dieta durante un año. La IDA más baja basada en datos microbiológicos se ha considerado la IDA más importante para garantizar la seguridad a los consumidores (EMEA, 1997).

Para establecer el análisis del riesgo microbiológico se usa la fórmula recomendada por EMEA (1997):

$$IDA = \frac{\frac{\text{Media geométrica de la CMI}_{50} \times CF2}{CF1} \quad (\mu\text{g/ml}) \times \text{bolo diario fecal (0.15 l)}}{\frac{\text{fracción de una dosis oral disponible para microorganismos}}{\text{x peso de una persona (60 kg)}}} \quad (\mu\text{g/kg p.c.})$$

Basado en la fórmula anteriormente indicada, la IDA microbiológica puede ser calculada del siguiente modo:

$$IDA = \frac{\frac{0.606 \times 2}{1} \times 150}{(1 - 0.5) \times 60} = 6.06 \mu\text{g/kg p.c. (363.3 } \mu\text{g/persona)}$$

Donde:

- Los valores *in vitro* de la CMI provienen de un total de 83 cepas diferentes de 9 generos de los microorganismos mas representativos que se encuentran en el intestino humano. Se calculó una CMI₅₀ de 0.606 µg/ml de todos los géneros sensibles (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* y *Enterococcus*) que fueron ensayados a un pH de 6,6 y 10⁹ cfu/ml.
- CFI = 1 porque se usó el valor medio CMI₅₀ para todas las especies sensibles; resistencia cromosómica natural.
- CF2 = 2 para corregir el aumento de densidad del inóculo en una situación *in vivo*; no se consideró necesario corregir el pH.
- 1 es la fracción de la dosis oral disponible para los microorganismos en la parte distal del tracto gastrointestinal porque en algunas especies animales el 99% de la dosis oral se excretó por las heces y no existen datos para humanos. Este valor se corrigió por un factor de 0,5 para tener en cuenta la naturaleza de los residuos en heces.
- 150 g es el peso del bolo fecal diario.
- 60 kg es el peso corporal del hombre.

2.5. Indicaciones terapéuticas

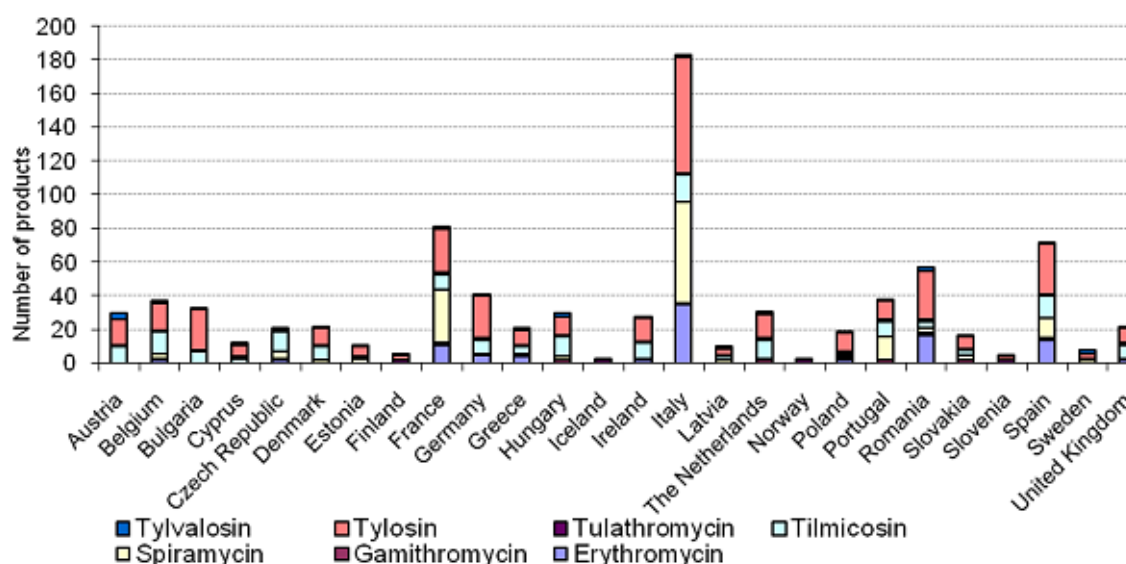
Los macrólidos son ampliamente usados para el tratamiento de enfermedades comunes en animales productores de alimentos. Por el momento, en la Unión Europea (EMA, 2009), se han autorizado 7 antibióticos macrólidos eritromicina, tilosina,

tilvalosina, espiramicina, tilmicosina, tulatromicina y gamitromicina, para uso en animales productores de alimentos por administración parenteral, y por vía oral como premezcla medicamentosa (Tabla 8). En la Figura 4 se indica el uso de productos de macrólidos por Estado Miembro de la Unión Europea (datos recogidos en el año 2009).

Tabla 8. Macrólidos autorizados en el Unión Europea como medicamentos veterinarios en animales productores de alimentos para los que han sido establecidos LMR.

Compuesto antimicrobiano	Vía de administración	Procedimiento de autorización	Especies animales con LMR
Macrólidos			
Eritromicina	Inyección, oral, intramamaria	Nacional	Todos los animales productores de alimentos
Gamitromicina	Inyección	Centralizado	Bóvidos
Espiramicina	Inyección, oral, intramamaria	Nacional	Bóvidos, cerdos y pollos
Tilmicosina	Inyección	Nacional	Todos los animales productores de alimentos
Tulatromicina	Inyección	Centralizado	Bóvidos y cerdos
Tilosina	Inyección, oral, intramamaria, e intrauterina	Nacional	Todos los animales productores de alimentos
Tilvalosina	Oral	Centralizado	Cerdos y pollos

Figura 4.- Número de productos de macrólidos por Estado Miembro (EMEA, 2009)



Las indicaciones y posologías de los macrólidos muestran una gran variación. En un principio, los macrólidos no tenían indicaciones muy específicas, en si se conocen como productos para el tratamiento y profilaxis de infecciones bacterianas susceptibles a estas sustancias. Las principales indicaciones en cerdos son neumonía, enteritis y artritis; en ganado vacuno infecciones comunes tales como infecciones respiratorias y genitales y mastitis; y en aves infecciones respiratorias y enteritis necrótica. Algunas premezclas medicamentosas contienen macrólidos en combinación con otros antimicrobianos tales como colistina o aminoglucósidos, y en ocasiones también con sulfamidas, trimetoprim, oxitetraciclina o ampicilina. En ocasiones, el tratamiento suele ser de larga duración (4-5 semanas) como es el caso de la tilosina en premezclas medicamentosas.

En la actualidad, los macrólidos son más restrictivos y se usan frente a patógenos dianas que incluyen:

- Infecciones respiratorias causadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*. y *Mycoplasma bovis*.
- Queratoconjuntivitis asociada con *Moraxella bovis*.
- Neumonía enzoótica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* y en la artritis por *Mycoplasma*
- Diarrea neonatal causada por *Clostridium perfringens*
- Enteropatía proliferativa causada por *Lawsonia intracellularis*

En relación con el macrólido objeto de nuestra memoria, se conoce que la tilosina, sales de fosfato y tartrato, son usadas en cerdos, ganado vacuno y pollos para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos sensibles. La tilosina se utiliza en el tratamiento de la neumonía, pododermatitis séptica, metritis y disentería en animales de granja. Debido a la facilidad de distribución de la tilosina desde el torrente sanguíneo hacia las glándulas mamarias de ovejas lactantes después de su administración intramuscular hacen que se use en casos de mastitis con reacciones sistémicas (Gutiérrez y Rodríguez, 1993). La tilosina se administra en pienso, agua de bebida o inyectada intramuscularmente para el tratamiento de Enfermedad Crónica respiratoria (CDR) (Shaddad *et al.*, 2007). Se puede usar vía oral en terneros, mediante

la leche de sustitución, a una dosis de 40 mg/kg p.c. y en ganado vacuno vía intramuscular a una dosis de 4-10 mg/kg p.c. En cerdos se puede administrar en el agua de bebida a una dosis de 25 mg/kg p.c., en el alimento a una dosis de 3-7 mg/kg p.c. o vía intramuscular a una dosis de 2-10 mg/kg p.c. para la prevención y control de enfermedades tales como la disentería o la neumonía enzoótica. En pollos se administra en el agua de bebida a una dosis equivalente a 35 mg/kg p.c. (EMEA, 1997). La tilosina estuvo autorizada como aditivo (promotor de crecimiento) para piensos de acuerdo a la Directiva 70/524/CEE, pero se suprimió su uso mediante el Reglamento (CE) 2821/98.

También en cerdos, la tilosina se utiliza para el control de enfermedades como la disentería porcina o la neumonía enzoótica porcina y se puede administrar en el agua de bebida a dosis de 5-25 mg/kg p.c. al día, en el pienso a dosis de 3-7 mg/kg p.c./día, o por inyección intramuscular a dosis de 5-20 mg/kg p.c./día. En aves, la tilosina se puede administrar en el agua de bebida (0,5 g/l) a dosis equivalente a 75 mg/kg p.c./día. Además también se puede administrar intramuscularmente a dosis de 20-120 mg/kg/p.c. al día (Plumb, 2002; Giguère, 2006). Se usa para el tratamiento de la enfermedad crónica respiratoria en pollos y la sinusitis infecciosa en pavos causadas por *Mycoplasma gallisepticum*. (Roberts *et al.*, 2009). La tilosina también está aprobada para el control de Loque americano en abejas en casos de emergencia a dosis de 200 mg/colmena en 20g de azúcar una vez a la semana durante 3 semanas (FDA, 2005).

La tilosina está registrada para uso exclusivamente veterinario en diversos países, principalmente para el uso de enfermedades respiratorias crónicas complejas en pollos y sinusitis infecciosa en pavos causadas por *Mycoplasma gallisepticum*. También se emplea para tratar enfermedades respiratorias porcinas y bovina y la disentería porcina (FAO, 2008).

En gatos, la tilosina ha mostrado ser muy eficaz para el tratamiento de las infecciones complejas del tracto respiratorio superior, utilizada a dosis diarias de 4-10 mg/kg por vía IM. También tiene diversas aplicaciones en perros para el tratamiento de infecciones tales como abscesos, tonsilitis, traqueobronquitis, neumonía o pioderma debido a *Streptococci*, *Staphylococci*, anaerobios y *Mycoplasmas* (Máttar *et al.*, 2007).

En lo que respecta a los peces, como animal elegido en la presente memoria, la gastroenteritis de la trucha es un síndrome entérico que afecta ampliamente a nivel comercial en las piscifactorías especialmente durante el verano (Urdaci *et al.*, 2001;

Michel *et al.*, 2002; del Pozo *et al.*, 2009). Los síntomas clínicos de este síndrome incluyen congestión y edema de la pared intestinal con mortalidad, síndrome asociado con la presencia de grandes números de las bacterias filamentosas segmentadas “*Candidatus arthromitus*”, por lo que se sugiere a este microorganismo como agente etiológico; ningún otro patógeno bacteriano ha sido caracterizado en este síndrome entérico. En general la mortalidad es mayor en el verano cuando la temperatura del agua es superior a 15°C, y alcanza pérdidas de 3-4%, la mortalidad dura unos 15-30 días, por lo que origina una pérdida económica significativa. Michel *et al.* (2002) examinaron la microflora del tracto intestinal de la trucha con síndrome entérico. Únicamente identificaron al patógeno bacteriano “*Candidatus arthromitus*”. La mayoría de las bacterias aisladas pertenecían a las *Enterobacteriaceae* o a las *Aeromonadaceae*, y aunque algunas de las especies identificadas se han descrito como patógenos oportunistas, no pudieran ser obligatoriamente patógenos.

La gastroenteritis de la trucha, se ha descrito en diversos países de Europa. En Francia, España y en el Reino Unido fueron los países donde primero se detectó y en la actualidad es un problema significativo en la industria alimentaria de la trucha (Sanz, 2000; Michel *et al.*, 2002; Branson, 2003; del Pozo *et al.*, 2009). Diversas estrategias se vienen ensayando y utilizando para el control de este síndrome catalogado como infeccioso (Del-Pozo *et al.*, 2010), incluyendo el tratamiento oral con antibióticos tales como amoxicilina, tetraciclina y oxitetraciclina, sulfonamidas (Urdaci *et al.*, 2001; Branson, 2003) y también la fluoroquinolona flumequina (Sarti *et al.*, 2008), aunque por el momento no se han descrito datos de eficacia. Estudios preliminares llevados a cabo por nuestro laboratorio apuntan al uso de tilosina como un tratamiento eficaz para la prevención y control de esta enfermedad en los sistemas de producción de la trucha en piscifactorías.

2.6. Control de residuos de Tilosina A en productos alimenticios de origen animal

La utilización de medicamentos veterinarios en animales destinados a consumo humano puede ser causa de aparición de residuos en los productos alimenticios que se obtienen de dichos animales. Aunque el uso de medicamentos veterinarios y otros compuestos utilizados como aditivos en la alimentación puede suponer una ventaja en la producción animal, no deben usarse sin tener conocimiento sobre los residuos que

pueden provocar sino se hace un adecuado manejo de los medicamentos, con el fin de que los productos alimenticios obtenidos del animal tratado respondan a las características de calidad e inocuidad para el consumidor que dicta la normativa en vigor (Suárez, 2009).

Los residuos de estas sustancias pueden alterar la calidad higiénica (tóxicos bióticos y abióticos) y nutritiva (prótidos, lípidos y glúcidos) de los alimentos, así como su idoneidad para las transformaciones tecnológicas y las características organolépticas (aroma, olor, textura, color y terneza). Actualmente, las técnicas analíticas disponibles tienen la capacidad de detectar y determinar cuantitativamente concentraciones cada vez más bajas de residuos químicos en los alimentos. De acuerdo a ello, como medida de protección para la salud pública y en función de los datos toxicológicos, farmacológicos o microbiológicos se han establecido Límites Máximos de Residuos (LMR) para los medicamentos utilizados en veterinaria en los animales productores de alimentos (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999).

La tilosina fue el primer antibiótico en evaluarse por el Comité del Codex Alimentarius en su 12ª reunión (FAO/WHO, 1969). En esa reunión el Comité concluyó que la tilosina usada en piensos animales o en medicamentos veterinarios no debería dejar residuos en productos comestibles de origen animal. No se estableció ninguna IDA. Posteriormente, la tilosina fue evaluada en el 38ª reunión del Comité (FAO/WHO, 1991). Debido a las deficiencias en los datos toxicológicos y microbiológicos, el Comité no pudo establecer una IDA o recomendar unos LMRs para tilosina. Posteriormente se llevó a cabo una revisión exhaustiva de toda la información disponible en la literatura publicada relativa a métodos analíticos, farmacocinética y residuos de tilosina en diferentes especies animales (Lewicki, 2006). El antibiótico macrólido tilosina fue incluido en el Anexo I del Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo sobre Límites máximos de residuos (LMRs) de acuerdo con la Tabla 9.

Tabla 9. Anexo I del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Tejidos diana
Tilosina	Tilosina A	Bovino	100 µg/kg	Músculo
			100 µg/kg	Grasa
			100 µg/kg	Hígado
			100 µg/kg	Riñón
			50 µg/kg	Leche
		Porcino	100 µg/kg	Músculo
			100 µg/kg	Piel + Grasa
			100 µg/kg	Hígado
			100 µg/kg	Riñón
		Aves de Corral	100 µg/kg	Músculo
			100 µg/kg	Piel + Grasa
			100 µg/kg	Hígado
			100 µg/kg	Riñón
			200 µg/kg	Huevos

Debido a la preocupación por el insuficiente número de productos farmacéuticos para tratar las enfermedades animales, y especialmente en las especies de animales menores, el Comité de Productos Veterinarios de la EMEA realizó una revisión de la evaluación del riesgo para el establecimiento de los LMRs y adoptó una Guía de Análisis de Riesgo para Productos Veterinarios en Alimentos de Origen Animal (EMEA, 2001). Esta guía permite extrapolar los valores de LMRs a todas las especies de animales productoras de alimentos, pues se ha determinado que los valores de LMRs son o ligeramente diferentes para ganado, cerdos o pollos. Para el caso de la tilosina, los LMRs establecidos cumplen con los criterios anteriores y es posible recomendar la extrapolación de los LMRs debido a que los mismos valores de LMRs se podrían aplicar a todas las especies productoras de alimentos, existiendo un método analítico para detectar residuos de tilosina en tejidos comestibles, huevos y leche. La evaluación de este método indica que no debería suponer ningún problema poder extrapolar los resultados a tejidos de otras especies animales, incluidos los peces. Hay que considerar que los resultados obtenidos para bovino, porcino y aves fueron los mismos, y que anteriormente se había establecido una IDA microbiológica de 6 µg/kg p.v. (360 µg por persona de 60 kg). Se estima que extrapolando los LMRs a todas las especies animales

productoras de alimentos la ingesta diaria de un consumidor no excedería del 80% de la IDA (EMEA, 2000; EMEA, 2002a).

Actualmente, la reglamentación sobre los LMR de tilosina se encuentra incluida en el Anexo del Reglamento (CE) n° 37/2010 de la Comisión (Tabla 10).

Es necesario un método analítico validado para la cuantificación del residuo marcador en los tejidos diana para el control de los LMR.

Muchos métodos analíticos han sido descritos para la determinación de tilosina y otros antibióticos macrólidos en tejidos. Los métodos más específicos incluyen la cromatografía líquida con detección ultravioleta (HPLC-UV) (Tabla 11), así como también la combinación de cromatografía líquida con espectrometría de masas (HPLC-MS-MS) (Tabla 12). Estos métodos son los preferidos para aspectos regulatorios. En la actualidad los métodos más tomados en consideración a efectos de cumplimiento del LMR, son los que utilizan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a – espectrometría electrospray ionización de masas (ESI-MS)- espectrometría de masas/MS.

Tabla 10. Límites máximos de residuos (LMRs) para la tilosina. Anexo del Reglamento (UE) n° 37/2010 de la Comisión

Sustancia farmacológica-mente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Tejidos diana	Otras disposiciones	Clasificación
Tilosina	Tilosina A	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	100 µg/kg	Músculo	<ul style="list-style-type: none"> • Para los peces, el LMR en el músculo se refiere a «músculo y piel en proporciones naturales». • Los LMR en la grasa, el hígado y el riñón no se aplican a los peces. • Para el porcino y las aves de corral, el LMR en la grasa se refiere a «piel y grasa en proporciones naturales». 	Antiinfecciosos /Antibióticos
			100 µg/kg	Grasa		
			100 µg/kg	Hígado		
			100 µg/kg	Riñón		
			50 µg/kg	Leche		
			200 µg/kg	Huevos		

Tabla 11. Métodos por HPLC para el control de residuos de tilosina en alimentos de origen animal.

Método de detección	Matriz	Compuesto	LOD ^{a,b} (µg/kg)	Validación ^c	Referencia
HPLC-UV	Bovidos: músculo, riñón, hígado	Tilosina	15	Si	Keng y Boison (1992)
HPLC-UV	Bovidos: músculo, riñón Cerdos: músculo, riñón	Tilosina Tilmicosina	20		Chan <i>et al.</i> (1994)
HPLC-UV	Bovidos: leche	Tilosina	12.5-15 ^d		Usleber <i>et al.</i> (1997)
HPLC-UV	Cerdos: músculo, riñón, hígado, grasa	Tilosina	5-16	Si	De Liguoro <i>et al.</i> , 1998
HPLC-UV	Bovidos: músculo, hígado Cerdos: músculo, riñón, hígado Pollos: músculo, hígado	Tilosina Espiramicina Josamicina Kitasamicina	50		Horie <i>et al.</i> (1998)
HPLC-UV	Bovidos, Cerdos, y Pollos: músculo	Tilosina Espiramicina Tilmicosina	15	Si	Juhel-Gaugarin <i>et al.</i> (1999)
HPLC-UV	Bovidos: leche	Tilosina	< 50 ^d		Dudriková <i>et al.</i> (1999)
HPLC-UV	Bovidos, Cerdos, y Pollos: músculo, riñón, hígado, grasa	Tilosina	50 ^e	Si	Prats <i>et al.</i> (2001)
HPLC-UV	Pollos: músculo	Tilosina Espiramicina Tilmicosina Josamicina Kitasamicina	30 ^d		Leal <i>et al.</i> (2001)

^a – límite de detección (LOD)

^b – para métodos multi-residuos solo el valor para tilosina es especificado

^c – declarado por los autores

^d – µg/l

^e – límite de cuantificación (LOQ)

Tabla 12. Métodos por HPLC-MS y HPLC-ESI-MS-MS para el control de residuos de tilosina en alimentos de origen animal.

Método de detección	Matriz	Compuesto	LOD ^{a,b} (µg/kg)	Validación ^c	Referencia
PB/HPLC-MS	Bovidos: músculo	Tilosina	10		Delépine <i>et al.</i> (1994)
PB/HPLC-MS	Bovidos: músculo	Tilosina Espiramicina Tilmicosina Josamicina Eritromicina	50		Delépine, <i>et al.</i> (1996)
MRM HPLC-ESI-MS-MS	Bovidos, cerdos, Pollos: músculo, riñón, hígado, leche, huevos	Tilosina Espiramicina Tilmicosina Josamicina Eritromicina	0,01-37	Si	Dubois <i>et al.</i> (2001)
SRM micro-LC-API-MS-MS	Bovidos: músculo, riñón, hígado	Tilosina Tilmicosina Eritromicina	30-40 ^e	Si	Draisici, <i>et al.</i> (2001a)
HPLC-ESI-MS-MS	Cerdos: músculo, riñón, hígado, piel + grasa	Tilosina	0,2-0,8 5 ^e	Si	Cherlet <i>et al.</i> (2002)
HPLC-ESI-MS	Pollos: músculo	Tilosina Espiramicina Tilmicosina Josamicina Kitasamicina Eritromicina Oleandomicina	1 ^d		Codony, <i>et al.</i> (2002)
HPLC-ESI-MS-MS	Gallinas: huevos	Tilosina Eritromicina Novobiocina + 4 Ionóforos	~1 ^d	Si	Heller y Nochetto, (2004)
MRM HPLC-ESI-MS-MS	Gallinas: huevos	Tilosina Espiramicina Tilmicosina Eritromicina Oleandomicina	0,1	Si	Wang <i>et al.</i> (2005)
HPLC-ESI-MS-MS	Gallinas: huevos	Tilosina	1 ^e	Si	Hamscher <i>et al.</i> (2006)
<p>PB – interfaz partícula de emisión; interfaz de haz MRM – monitorización reacción múltiple ESI – ionización electrospray SRM - monitorización reacción seleccionada API – ionización a presión atmosférica</p> <p>^a – límite de detección (LOD) ^b - para métodos multi-residuos solo el valor para tilosina es especificado ^c – declarado por los autores ^d - µg/l ; ^e - límite de cuantificación (LOQ)</p>					

2.7. Justificación del trabajo y objetivos

En acuicultura, la cría intensiva de diversas especies acuícolas, hace necesario muy a menudo el uso de agentes antimicrobianos con fines profilácticos y/o terapéuticos. El ciclo corto, unos 12-16 meses, en el caso de la trucha arco iris hace que la más mínima infección o retraso en el crecimiento de los animales se traduzcan en cuantiosas pérdidas económicas para el acuicultor.

La utilización adecuada de los antimicrobianos en la medicina humana y veterinaria es uno de los principales ámbitos de la política de la Unión Europea pertinentes para abordar el problema de la resistencia a los antimicrobianos. Las mismas estrategias que se utilizan para reducir la utilización de antimicrobianos en otros animales de granja, también se deben tomar en consideración en la acuicultura. No cabe duda que deben aplicarse acciones para prevenir y reducir la necesidad de utilizar antimicrobianos en acuicultura tales como (1) fomentar sistemas de producción que proporcionen condiciones ambientales apropiadas para los animales de acuicultura en las explotaciones, en particular con respecto a la calidad y el caudal de agua, los niveles de oxígeno y la nutrición; (2) fomentar la utilización de antibiogramas antes del tratamiento antibiótico, siempre que sea posible; (3) fomentar el desarrollo de determinados programas de vigilancia de enfermedades para identificar y ayudar a prevenir posibles brotes de enfermedades, (4) aplicar medidas concretas para impedir la introducción y propagación de infecciones, tales como fomentar el buen uso de antimicrobianos en acuicultura en base a los datos específicos en peces obtenidos a partir de estudios de eficacia y seguridad de los antimicrobianos implicados (CE, 2015)

El conocimiento de la farmacocinética y de los residuos de un agente terapéutico se hace del todo necesario, de forma que su utilización se haga bajo unas bases definidas de eficacia y seguridad. De hecho, la falta de conocimiento de la farmacocinética de un medicamento, puede conllevar que un compuesto farmacológicamente idóneo, se someta a un irracional régimen terapéutico, y provoque una actividad o eficacia insuficiente, o bien de lugar a una toxicidad inaceptable.

Desde el punto de vista clínico y toxicológico la farmacocinética es el estudio de los factores que deben considerarse para conseguir niveles de un fármaco óptimos, predecibles, terapéuticamente eficaces y seguros, a partir de la forma de administración del medicamento.

Los datos concernientes a la cinética de depleción de residuos en fluidos orgánicos y en tejidos de animales productores de alimentos son básicos para establecer, basándose en los niveles tolerables, los tiempos de espera o de retirada que aseguren unos niveles residuales tisulares por debajo de los LMR fijados por la Comisión Europea, como medida de salud pública o de seguridad para el consumidor.

Conjuntamente, los estudios de toxicidad marcan la base para el establecimiento del LMR. La EMEA establece los LMR para los medicamentos veterinarios en función de datos toxicológicos relevantes. Los LMR conciernen a la seguridad de los residuos de la sustancia en alimentos destinados al hombre y también sobre el proceso tecnológico e industrial de los alimentos. Los LMR de los medicamentos de uso veterinario deben especificar el residuo marcador y el tejido diana a efectos de una monitorización o control.

La tilosina, antibiótico objeto de nuestro estudio, en acuicultura, puede jugar un papel importante por su amplio espectro de actividad antimicrobiana y buena distribución orgánica. Teniendo en cuenta sus indicaciones terapéuticas en las especies bovina, ovina, caprina, porcina y aves, se ha hecho imprescindible a efectos de su eficacia el conocimiento previo de la farmacocinética de este agente antimicrobiano en cada una de las especies de destino. En el caso de los peces, concretamente trucha arco iris, la tilosina es un antimicrobiano de gran proyección, pero desafortunadamente no existen datos publicados que definan el comportamiento farmacocinético en diversas especies de peces que sufren diferentes enfermedades infecciosas para poder elegir un régimen de dosificación adecuado al objeto de predecir una eficacia y minimizar el desarrollo o aparición de resistencias.

El interés terapéutico de este agente macrólido antimicrobiano se basa en cuatro aspectos fundamentales:

1. La recomendación de uso de antimicrobianos en medicina veterinaria para animales productores de alimentos no contemplados comúnmente en medicina humana, como es el caso de tilosina que solo se utiliza en medicina veterinaria.
2. El creciente aumento de resistencias frente a antibióticos existentes en el mercado.

3. La falta de datos científicos sobre farmacocinética y depleción de residuos en el caso de la tilosina en la trucha arco iris, especie de consumo humano.

4. En estudios preliminares realizados por nuestro grupo de investigación donde se ha detectado que la tilosina podría ser eficaz en la gastroenteritis de la trucha, síndrome entérico asociado con la presencia de la bacteria “*Candidatus arthromitus*” que causa gran pérdida económica en acuicultura.

En función de todo lo expuesto, la presente memoria tiene por objeto realizar: (1) un estudio farmacocinético y (2) un estudio de depleción de residuos de la tilosina en trucha arco iris, con el fin de obtener datos relacionados con la eficacia y seguridad que puedan ser aplicados en un futuro en el campo de la terapéutica acuícola.

Debido a que la tilosina representa la mezcla de 4 derivados y porque comúnmente el componente mayor de la mezcla (>80%) es tilosina factor A, componente con mayor potencial microbiológico, junto con pequeñas cantidades de otros tres factores, desmicosina (factor B), macrosina (factor C) y relomicina (factor D) dependiendo de la fuente de fabricación, nuestra investigación va dirigida a definir el perfil farmacocinético y la depleción de residuos del antibiótico tilosina A en la especie pesquera, trucha arco iris, especie destinada a consumo humano.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 249 truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) divididas en 3 grupos:

Grupo 1 (180 truchas), truchas utilizadas para investigar la cinética plasmática de tilosina A tras la administración única y múltiple oral de tilosina a dosis de 40 mg/kg p.c.

Grupo 2 (49 truchas), truchas utilizadas para el estudio de distribución y depleción tisular de residuos de tilosina A después de una dosis múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días.

Grupo 3 (20 truchas), truchas que no recibieron tratamiento y se emplearon para recoger plasma y muestras tisulares (piel + músculo en proporciones naturales) blanco para determinar la validación del método analítico elegido.

La fase experimental del presente estudio se ha llevado a cabo en IPEASA (Industrias Piscícolas Españolas Agrupadas, S.A.) en el Centro Piscifactoría de Fuentidueña (Segovia), industria a la que se expresa un profundo agradecimiento por la colaboración prestada en el desarrollo del trabajo.

El antibiótico macrólido tilosina en forma de tartrato (AF1300 Tylan soluble) fue donado por Eli Lilly and Company Limited, Liverpool L24 9LN (con una pureza de 93,1% de tilosina A, y 97,1% de tilosina A+B+C+D).

3.1 Protocolo y diseño experimental

3.1.1. Estudio farmacocinético de tilosina en truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

Se seleccionaron 180 truchas sanas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) y en buen estado nutricional de peso corporal medio 200 ± 10 g. Fueron anestesiadas sumergiéndolas en un baño con 2-fenoxietanol durante 2 minutos para su peso y medida. Seguidamente se alojaron en tanques y fueron sometidas a un periodo de observación y aclimatación de 7 días con el fin de eliminar el anestésico y detectar cualquier signo clínico o comportamiento anómalo que hiciese sospechar de enfermedades que impedirían su inclusión en el protocolo experimental desarrollado. En

el período de tiempo indicado no se observó en los peces ningún indicio de alteraciones zootécnicas o de enfermedad que aconsejara su exclusión. Durante este periodo, a los peces se les suministró pienso *ad libitum*. El pienso utilizado durante la experimentación fue específico para peces, del tipo D-4 EXCEL 2P, con un tamaño de pellet de 0,3 cm de diámetro, preparado por la empresa Trow España, S.A. (Skretting, Burgos) con la siguiente composición:

- Pienso sin medicar: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5% y aceite de soja 5%.

- Pienso medicado: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5%, aceite de soja 5% y tilosina en una concentración de 3 g tilosina/kg pienso. En el pienso medicado se comprobó la concentración de tilosina mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrofotometría de masas (HPLC-MS).

Las condiciones del tanque (TP-1) donde se alojaron las truchas fueron:

Tanque TP-1

- Volumen del tanque: 10 m³
- Concentración de O₂ : 6,6 mg/l
- Temperatura: 18 °C
- pH: 8

A los animales del Grupo 1 (180 truchas) se les administró oralmente vía pienso una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos. La concentración del pienso administrado fue de 4 g tilosina/kg pienso. El pienso medicado se suministró a los peces, siempre a la misma hora (8,00 h a.m.), constatándose que en un tiempo máximo de 15 minutos los peces consumen el pienso medicado (pellet) echado en el agua. A cada trucha se le suministró diariamente una cantidad de pienso igual al 1% del peso corporal medio, es decir, 2 g de pienso medicado/día, tomando como 200 g el peso corporal medio de la trucha, por lo tanto cada animal recibe oralmente 8 mg tilosina/200 g p.c./día, durante cinco días consecutivos.

Se eligió para el estudio la dosis de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días por ser la dosis que más comúnmente se está utilizando en piscifactorías, al objeto de obtener datos farmacocinéticos que puedan o no justificar esta dosis terapéutica.

El 1º día de tratamiento (D1) a los animales (180 truchas) se les administró oralmente 360 g de pienso medicado con tilosina (4 g tilosina/kg pienso). Se administraron 2 g de pienso medicado para cada animal (tomando el peso medio de cada animal 200 g) de forma que recibieron una dosis de 8 mg tilosina/pez (cantidad equivalente a una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c.). Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Transcurrido este tiempo de 15 minutos, los animales se anestesiaron (2-fenoxietanol), 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h y 12 h, recogiendo muestras de sangre (a partir de la vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad de pienso medicado equivalente a una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 truchas tratadas a otro tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 1ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

El 2º día de tratamiento (D2) se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxietanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 1ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (126 truchas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxietanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 4 h, 8 h y 12 h post-dosis (2ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad

de pienso medicado equivalente a una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 truchas tratadas al tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 2ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

El 3º día de tratamiento (D3) se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxietanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 2ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (102 truchas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxietanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 4 h, 8 h y 12 h post-dosis (3ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad de pienso medicado equivalente a una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 truchas tratadas a otro tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 3ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

El 4º día de tratamiento (D4) se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxietanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 3ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (78 truchas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxietanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 4 h, 8 h y 12 h post-dosis (4ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo y registrando su peso corporal para el cálculo de la cantidad de pienso medicado equivalente a una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. en los peces restantes del experimento.

A última hora de la tarde se trasladaron 6 truchas tratadas a otro tanque TL-1 de 400 litros de capacidad. Estos seis peces serán los correspondientes para la toma de sangre a las 24 horas tras la 4ª dosis. Estos peces se aíslan previamente para evitar el estrés a los peces restantes del experimento.

El 5º día de tratamiento (D5) se tomaron muestras de sangre (vena caudal) de los 6 peces tratados, previamente anestesiados (2-fenoxietanol) para la obtención del punto de 24 h tras la 4ª dosis, registrándose también su peso corporal.

Seguidamente, a los animales restantes (54 truchas) (tanque TP-1) se les administró 2 g pienso medicado/200 g de peso corporal, recibiendo una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c. Una vez los peces tienen el pienso medicado se les dejó comer durante 15 minutos, constatando que los animales tomaron completamente la dosis administrada vía pienso medicado en este periodo de tiempo.

Seguidamente se anestesiaron (2-fenoxietanol) 6 animales/tiempo, a los tiempos de: 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h; 12 h; y 24 h post-dosis (5ª dosis) recogiendo muestras de sangre (vena caudal) a dichos intervalos de tiempo.

En la Tabla 13 se describen los tiempos de dosificación y los tiempos acumulados y toma de muestra de sangre de los peces tratados.

Tabla 13. Dosificación y tiempo del muestreo de sangre, en un total de 180 truchas, tras el tratamiento con tilosina a dosis de 40 mg tilosina /kg p.c., vía oral en pienso, durante cinco días consecutivos

	Tiempo tras dosis (h)	Tiempo acumulado tras la 1ª dosis	Nº de Animal y muestra					
1º DIA de tratamiento	1ª dosis	1ª dosis	40 mg tilosina/kg p.c. vía oral pienso					
	0,5	0,5	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6
	1	1	T 7	T 8	T 9	T 10	T 11	T 12
	2	2	T 13	T 14	T 15	T 16	T 17	T 18
	4	4	T 19	T 20	T 21	T 22	T 23	T 24
	6	6	T 25	T 26	T 27	T 28	T 29	T 30
	8	8	T 31	T 32	T 33	T 34	T 35	T 36
	10	10	T 37	T 38	T 39	T 40	T 41	T 42
	12	12	T 43	T 44	T 45	T 46	T 47	T 48
2º DIA de tratamiento	24	24	T 49	T 50	T 51	T 52	T 53	T 54
	2ª dosis		40 mg/kg p.c. vía oral pienso					
	4	28	T 55	T 56	T 57	T 58	T 59	T 60
	8	32	T 61	T 62	T 63	T 64	T 65	T 66
	12	36	T 67	T 68	T 69	T 70	T 71	T 72
3º DIA de tratamiento	24	48	T 73	T 74	T 75	T 76	T 77	T 78
	3ª dosis		40 mg/kg p.c. vía oral pienso					
	4	52	T 79	T 80	T 81	T 82	T 83	T 84
	8	56	T 85	T 86	T 87	T 88	T 89	T 90
	12	60	T 91	T 92	T 93	T 94	T 95	T 96
4º DIA de tratamiento	24	72	T 97	T 98	T 99	T 100	T 101	T 102
	4ª dosis		40 mg/kg p.c. vía oral pienso					
	4	76	T 103	T 104	T 105	T 106	T 107	T 108
	8	80	T 109	T 110	T 111	T 112	T 113	T 114
	12	84	T 115	T 116	T 117	T 118	T 119	T 120
5º DIA de tratamiento	24	96	T 121	T 122	T 123	T 124	T 125	T 126
	5ª dosis		40 mg/kg p.c. vía oral pienso					
	0,5	96,5	T 127	T 128	T 129	T 130	T 131	T 132
	1	97	T 133	T 134	T 135	T 136	T 137	T 138
	2	98	T 139	T 140	T 141	T 142	T 143	T 144
	4	100	T 145	T 146	T 147	T 148	T 149	T 150
	6	102	T 151	T 152	T 153	T 154	T 155	T 156
	8	104	T 157	T 158	T 159	T 160	T 161	T 162
	10	106	T 163	T 164	T 165	T 166	T 167	T 168
	12	108	T 169	T 170	T 171	T 172	T 173	T 174
	24	120	T 175	T 176	T 177	T 178	T 179	T 180

Para la toma de muestras de sangre, con el fin de coger con facilidad a los peces, éstos fueron previamente anestesiados sumergiéndolos durante 2 minutos en un baño de agua de 2-fenoxietanol en una concentración de 15 ml/100 l de agua. La muestra de sangre se recogió por punción en la vena caudal usando jeringas de 2 ml de volumen y agujas de 0,8 x 40 mm. Una vez anestesiados los peces, se pesaron y se recogieron muestras de sangre individualmente en tubos heparinizados y debidamente etiquetados; seguidamente se centrifugaron las muestras a 10.000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos y se aisló el plasma que se congeló a -45 °C hasta el posterior análisis de la concentración de tilosina A por HPLC-MS.

3.1.2. Estudio de distribución y depleción tisular en truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

Se seleccionaron 69 truchas sanas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) en buen estado nutricional de peso medio 200 ± 10 g. Los peces fueron anestesiados con 2-fenoxietanol para su peso y medida. Se alojaron en tanques y fueron sometidos a un periodo de observación y aclimatación con el fin de eliminar el anestésico de 7 días y detectar cualquier signo clínico o comportamiento anómalo que hiciese sospechar de enfermedades que impedirían su inclusión en el protocolo experimental desarrollado. En el período de tiempo indicado no se observó en los peces ningún indicio de alteraciones zootécnicas o de enfermedad que aconsejara su exclusión. Durante este periodo, a los peces se les suministró pienso *ad libitum*. El pienso utilizado durante la experimentación fue específico para peces, del tipo D-4 EXCEL 2P, con un tamaño de pellet de 0,3 cm de diámetro, preparado por la empresa Trow España, S.A. (Skretting, Burgos) con la siguiente composición:

- Pienso sin medicar: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5% y aceite de soja 5%.
- Pienso medicado: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5%, aceite de soja 5% y tilosina en una concentración de 3 g tilosina/kg pienso. En el pienso medicado se comprobó la

concentración de tilosina mediante cromatografía líquida de alta resolución. acoplada a espectrofotometría de masas (HPLC-MS).

Para el presente estudio, los peces del Grupo 2 (49 truchas) se dispusieron en un tanque (TP-2) cuyas condiciones fueron:

Tanque TP-2

- Volumen del tanque: 10 m³
- Concentración de O₂: 6,7 mg/l
- Temperatura: 18 °C
- pH: 7,8

A los animales del Grupo 2 (49 truchas) se les administró oralmente en el pienso una dosis de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos. El pienso se suministró durante 15 minutos, siempre a la misma hora (8,00 h a.m.). La dosis requerida de 40 mg tilosina/kg p.c./día se administró en forma de pienso medicado con una concentración de 4 g tilosina/kg pienso, recibiendo diariamente cada uno de los peces 2 g de pienso medicado (equivalente a 8 mg tilosina/pez/día). Se administraron 98 g de pienso medicado con tilosina/tanque/día, equivalente a 392 mg tilosina/49 peces/día, durante 5 días consecutivos. A cada trucha se le suministró diariamente una cantidad de pienso igual al 1% del peso corporal medio, es decir, 2 g de pienso medicado/día, tomando como 200 g el peso corporal medio de la trucha.

Al final del tratamiento de 5 días de duración, se sacrificó a los animales por decapitación previa anestesia. Se aisló piel y músculo, desechando cabeza, vísceras y espina dorsal. Se tomaron muestras de músculo + piel (en proporciones naturales) que fueron guardadas en bolsas etiquetadas. Dichas muestras se congelaron a -45°C para el posterior análisis de tilosina A por HPLC-MS. Se sacrificaron 7 animales/tiempo a los siguientes intervalos de tiempo:

Tiempo 3 horas (0,125 días) tras la última dosis.

Tiempo 24 horas (1 día) tras la última dosis.

Tiempo 72 horas (3 días) tras la última dosis.

Tiempo 120 horas (5 días) tras la última dosis.

Tiempo 168 horas (7 días) tras la última dosis.

Tiempo 240 horas (10 días) tras la última dosis.

Tiempo 336 horas (14 días) tras la última dosis.

Los animales del Grupo 3 (20 truchas) (tanque TP-3) no recibieron tratamiento y fueron usados como control para determinar la validación del método analítico. Fueron alimentados con pienso específico para peces, del tipo D-4 EXCEL 2P, con un tamaño de pellet de 0,3 cm de diámetro, preparado por la empresa Trow España, S.A. (Skretting, Burgos) con la siguiente composición: harina de pescado 26%; gluten de trigo 4%; gluten de maíz 15%; soja 22,5%; soja concentrada 5%; vitaminas 0,5%; guisantes 6%; aceite de pescado 11,5% y aceite de soja 5%.

Los peces del grupo 3 (20 truchas) se dispusieron en un tanque (TP-3) cuyas condiciones fueron:

Tanque TP-3

- Volumen del tanque: 10 m³
- Concentración de O₂: 6,6 mg/l
- Temperatura: 18 °C
- pH: 7,8

3.2. Método analítico de tilosina A en plasma y tejido de truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

En nuestro laboratorio, tras estudiar los métodos disponibles publicados para la cuantificación de tilosina A y en función de su sensibilidad y reproducibilidad, seleccionamos para nuestro trabajo el método descrito por Hamscher *et al.* (2006). Se realizó el análisis de tilosina A en muestras plasmáticas y tisulares de truchas siguiendo el método descrito por Hamscher *et al.* (2006) con algunas modificaciones introducidas por nosotros en el proceso de extracción. El ensayo demostró ser un método que cumple con los criterios de validación especificidad, linealidad, reproducibilidad, repetibilidad, precisión y sensibilidad.

El procedimiento de extracción de tilosina A en plasma y tejidos descrito por Hamscher *et al.* (2006) llevado a cabo con modificaciones introducidas en nuestro laboratorio fue el siguiente:

Se tomó cada muestra de plasma y se midió el volumen de plasma de cada una de ellas a las que se les adicionó 5 ml de una mezcla metanol:agua (3:1). Tras su mezcla se sometió a una agitación suave mediante un agitador Heidolph Reax 2000 durante 1 minuto. Se centrifugó a 3000 r.p.m. en centrífuga refrigerada (4 °C) Sorwall, modelo RC-5B, durante 10 minutos. A continuación se separó y se recogió el sobrenadante volviendo a añadir 5 ml de la mezcla metanol:agua (3:1) y esta extracción se repitió tres veces en total. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes recogidos en viales de vidrio topacio y se evaporaron bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó en 1 ml de la mezcla metanol:agua 3:1 y una alícuota de 50 µl se sometió al análisis de tilosina por HPLC-MS.

Para las muestras de tejido, la extracción de tilosina se realizó tomando 2 g de muestra de tejido (músculo + piel en condiciones naturales) procedente de un animal tratado que se homogenizaron por tratamiento ultrasónico en un homogenizador ultrasónico Labsonic U Braun 2000 durante 5 minutos en 5 ml de buffer fosfato pH 7, a una temperatura de 4°C. El homogenizado obtenido se centrifugó a 3000 r.p.m. en centrífuga refrigerada (4 °C) Sorwall, modelo RC-5B, durante 10 minutos. A continuación se separó y se recogió el sobrenadante volviendo a añadir 5 ml de acetonitrilo y esta extracción se repitió tres veces en total. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes recogidos en viales de vidrio topacio y se evaporaron bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó en 2 ml de la mezcla metanol:agua 3:1 y una alícuota de 50 µl se inyectó en el sistema cromatográfico acoplado a espectrofotometría de masas para el análisis de tilosina A.

El buffer fosfato pH 7 se preparó disolviendo 13,6 g de hidrógeno ortofosfórico dipotásico (K_2HPO_4) y 4 g de dihidrógeno ortofosfórico potásico (KH_2PO_4) en 1 litro de agua ultrapura Milli-Q.

El sistema cromatográfico utilizado fue un HPLC Shimadzu, modelo CBM-20A, equipado con detector de ultravioleta Shimadzu modelo SPD-20AV, dos bombas modelo LC-20AD acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo (QP) con ionización electrospray ESI LCMS-2020, inyector manual, válvula para trabajar con

muestras biológicas modelo FCV-20AH2 y software LC-MS solution. La columna utilizada fue una columna ACE 129-1002, C18-AR (5 μ m; 100 x 2 mm), equipada con una precolumna Teknokroma TR-C-160-1. El flujo de la bomba A fue mantenido a una velocidad de 0,5 ml/min y de 0,2 ml/min para la bomba B. La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fórmico 0,5%-acetato de amonio 1mM–metanol en una proporción de 1:4:5 (vol/vol).

La molécula fue ionizada con una fuente de ionización electrospray en modo positivo (ESI⁺). Se ajustó a una temperatura de interfase de 350 °C y una temperatura DL de 250°C, un flujo del gas de nebulización de 1,50 l/min y un gas de secado de 15,00 l/min. Todos los análisis fueron desarrollados en el modo de selección de ión (SIM). El equipo se ajustó a una detección de m/z de 916,60 para la tilosina A.

Las áreas de los picos en los cromatogramas de las muestras se cuantificaron usando la técnica del estándar externo por el uso de soluciones de referencia estándar de tilosina. La solución stock de tilosina A se preparó disolviendo 1 mg de tilosina A en 5 ml de metanol y fue almacenada en oscuridad a una temperatura de – 45° C. Las soluciones de trabajo del tilosina A se prepararon diariamente a partir de esta solución stock diluida en metanol:agua (3:1), obteniéndose soluciones de trabajo con concentraciones entre 0,001 μ g/ml a 10 μ g/ml. El estándar de tilosina A fue suministrado por Eli Lilly (Lilly corporate Center, Indianápolis, IN 46285), certificando una pureza de tilosina A del 93,1% .

Los resultados de la validación del método fueron los siguientes: las curvas de calibrado para la tilosina A fueron lineales en un rango de 0,001-10 μ g/ml, el coeficiente de correlación R fue de 0.9999. La recuperación media de tilosina A en plasma fue > 90% y del 70% en tejido. La precisión intra-día e inter-día presentó un coeficiente de variación < 5,5%. No existió ninguna interferencia con los compuestos endógenos propios del plasma y/o del tejido músculo+piel lo que evidencia la especificidad del método. Para el plasma y para el tejido músculo + piel en proporciones naturales, el límite de cuantificación fue 0,001 μ g/ml. El método utilizado fue específico para la sustancia analizada y no se observó en el cromatograma (Figura 5) ninguna interferencia con las sustancias endógenas propias de los fluidos y tejidos estudiados.

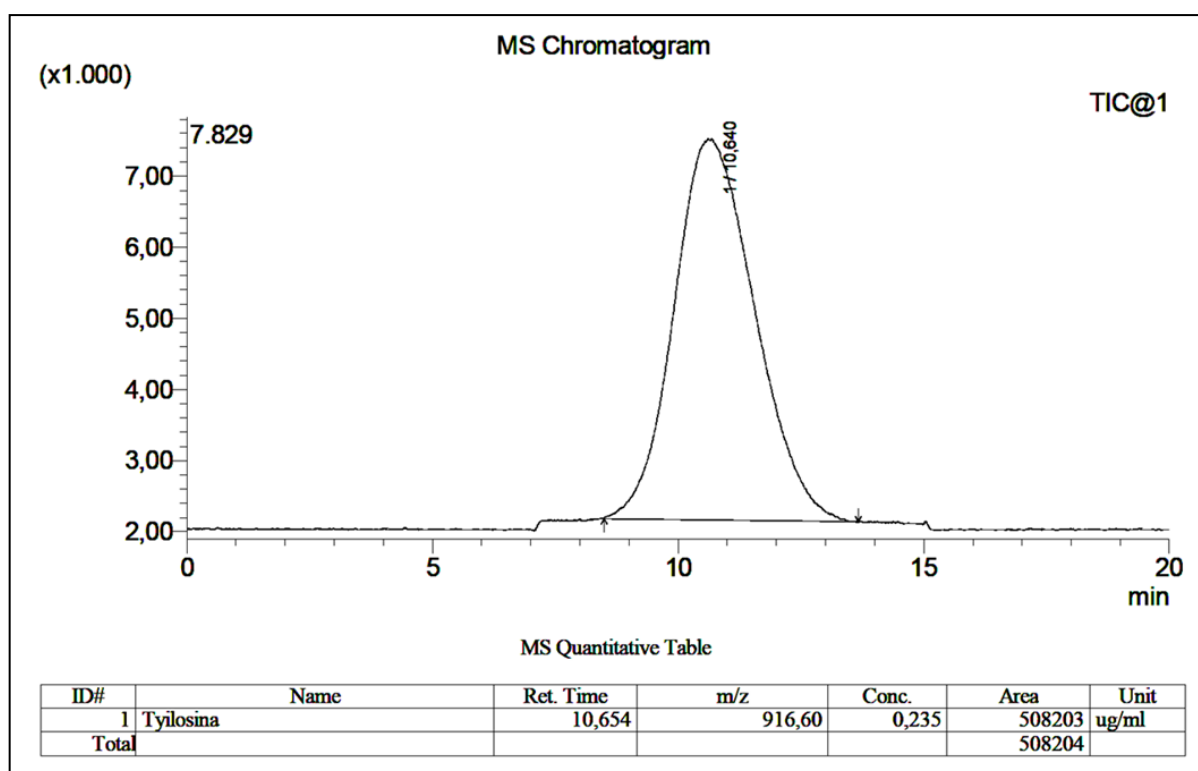


Figura 5. Cromatograma de una muestra de plasma blanco enriquecido con 250 ng/ml de tilosina A [1ml de plasma se enriquece con 250 ng/ml de tilosina A y se extraen en un volumen final de 1 ml (250 ng/ml)]. El volumen de inyección es 50 μ l (11,75 ng/50 μ l)

3.3. Análisis de datos

La curva de las concentraciones medias plasmáticas de tilosina A obtenidas tras la administración oral múltiple de 40 mg tilosina/kg p.c. se fijaron secuencialmente a un modelo compartimental, monocompartimental, bicompartimental y múltiple por el uso del programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo elegido fue aquél que obtuviera el valor más pequeño del Criterio de Información de Akaike (Yamaoka *et al.*, 1978). El modelo bicompartimental fue el mejor estimado. Este modelo fue utilizado para establecer los parámetros farmacocinéticos. Tras administración oral de tilosina, las curvas de las concentraciones plasmáticas vs tiempo declinaron biexponencialmente y los datos se ajustaron a la siguiente ecuación (Wagner, 1975; 1976):

$$C_p = A_1 \times e^{-\alpha t} + A_2 \times e^{-\beta t} - A_3 \times e^{-K_a t} \quad (\text{vía oral})$$

Siendo:

C_p Concentración plasmática del fármaco.

A_1, A_2, A_3 Coeficientes matemáticos, (es decir A_1 y A_2 son las concentraciones plasmáticas extrapoladas tiempo cero de la primera y segunda fase de eliminación del fármaco y A_3 de la fase de absorción).

α Constante híbrida de la fase inicial de distribución.

β Constante híbrida de la fase terminal de eliminación.

K_a Constante de absorción, constante de primer orden.

t Tiempo.

El modelo farmacocinético bicompartimental considera al organismo dividido en dos compartimientos: central y periférico.

El compartimiento central está formado por el plasma, los fluidos intersticiales y el agua intracelular asequible (tejidos bien irrigados). Por definición, la distribución de un medicamento en todos los elementos del compartimiento central sería instantánea, y su concentración uniforme e igual a la existente en el plasma. Por otro lado, el compartimiento periférico lo constituyen el agua intracelular profunda (tejidos poco vascularizados) y los depósitos no acuosos (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos intracelulares). En este caso, un fármaco accedería a este compartimiento más lentamente desde el plasma, transcurriendo un tiempo antes de la consecución del equilibrio de la concentración del fármaco en el organismo.

En el seno del compartimiento central se materializan los procesos de eliminación del fármaco por metabolismo y excreción, regidos por una constante de eliminación (K_{10}). Este compartimiento canalizaría además el proceso de distribución de fármaco al compartimiento periférico (K_{12}), y en el caso de administración extravasal, también el proceso de absorción, caracterizado por la constante de absorción (K_a).

En el compartimiento periférico, desprovisto de mecanismos metabólicos y excretores de importancia, el fármaco permanece depositado pasivamente y su retorno

al plasma (regido por la constante de retorno K_{21}) depende del grado de eliminación del compartimiento central y de la afinidad que presente el fármaco hacia los depósitos no acuosos.

Aunque la velocidad de acceso del fármaco a los diferentes elementos del compartimiento periférico no es la misma y la velocidad de retorno al compartimiento central tampoco lo es, en la práctica los retrasos en la distribución y en el retorno se consideran aditivos y están cuantificados globalmente por las constantes K_{12} y K_{21} . Del mismo modo, la constante de absorción (K_a) engloba las de liberación y absorción, y la constante de eliminación (K_{10}) engloba las de metabolismo y excreción.

Se asume que los procesos de distribución y eliminación asociados con este modelo obedecen a cinéticas de primer orden (Figura 6), lo que significa que la velocidad con la que un fármaco se absorbe y se elimina a partir del compartimiento central es proporcional a la concentración del fármaco en dicho compartimiento.

Las curvas concentración-tiempo (Figura 7), presentadas en forma semilogarítmica, demuestran una fase de absorción en la concentración plasmática del fármaco (1) y una fase de eliminación (2) en la concentración plasmática del fármaco que principalmente se debe a una distribución (por difusión pasiva) del fármaco desde el compartimiento central al compartimiento periférico. Una vez se ha alcanzado un equilibrio de pseudo-distribución, la velocidad de eliminación en la concentración plasmática se reduce y viene determinada principalmente por la eliminación del fármaco del compartimiento central. Esta porción terminal lineal de la curva de disposición se denomina fase β de “eliminación” y a partir de su pendiente ($-\beta/2,303$) se deriva la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) del fármaco. Resolviendo la curva de disposición en sus componentes por el método de residuales, se obtienen los segmentos lineales denominados fase de “absorción” y fase de “distribución” (Gibaldi *et al.*, 1969; Wagner, 1975; 1976).

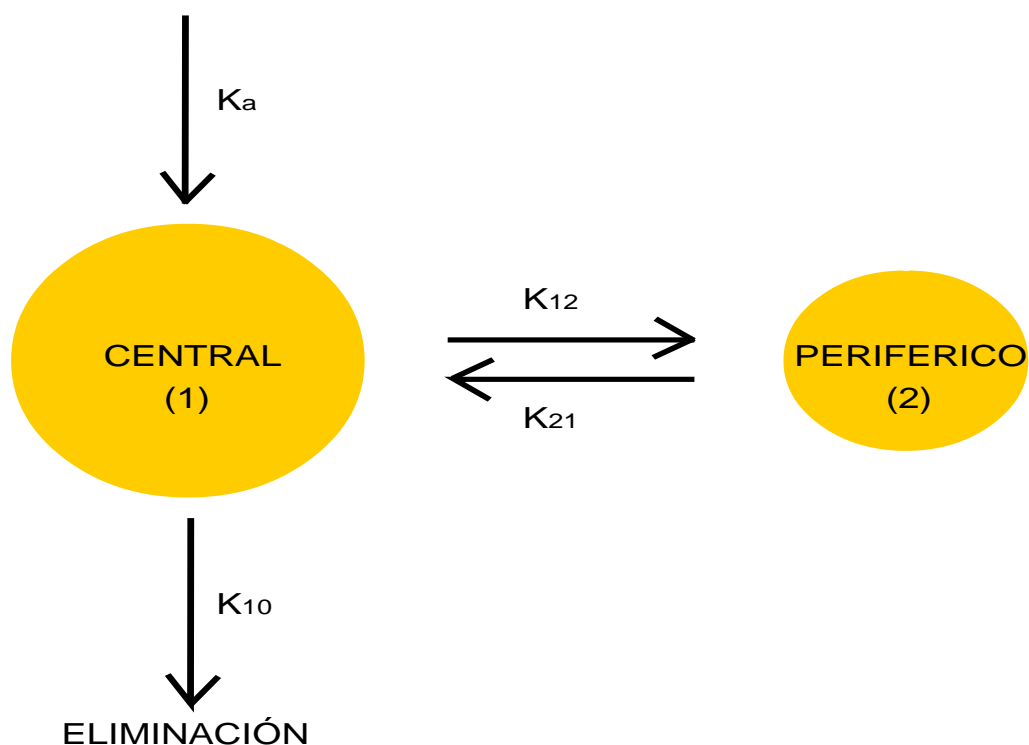


Figura 6. Diagrama esquemático de un modelo abierto bicompartimental. El fármaco, una vez localizado en el compartimiento central se distribuye instantáneamente. La distribución entre el compartimiento central y el compartimiento periférico tiene lugar más lentamente; K_{12} , K_{21} , son constantes de primer orden para la transferencia del fármaco entre los dos compartimientos. La eliminación se asume que tiene lugar exclusivamente desde el compartimiento central; K_{10} es una constante de primer orden para la eliminación del fármaco a partir del compartimiento central

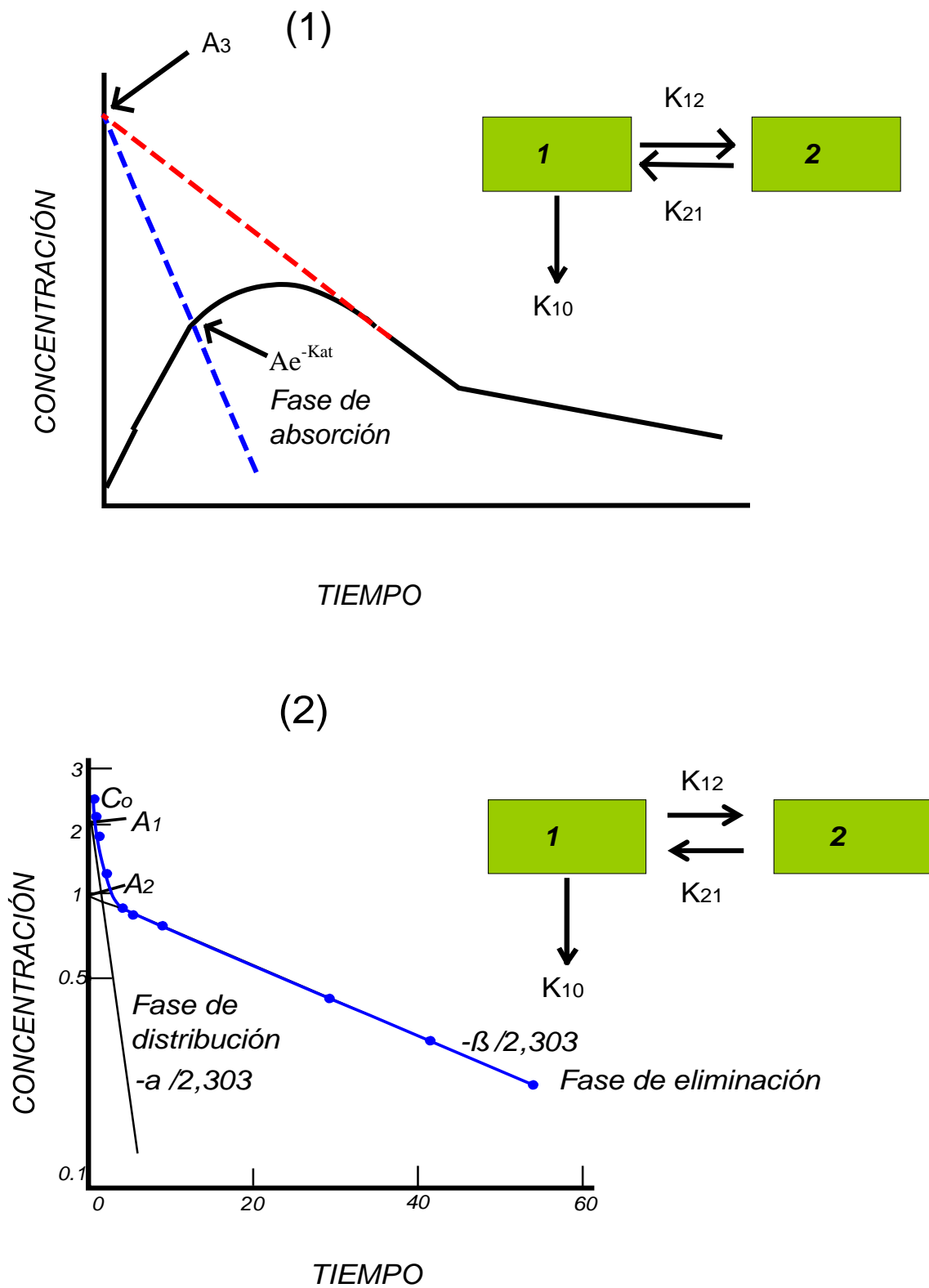


Figura 7. Distintas fases de los perfiles de concentración plasmática de un fármaco tras administración de una dosis oral (1) e intravenosa (2)

En los estudios de disposición, los coeficientes **A₁**, **A₂** y **A₃** y las constantes de disposición **α**, **β** y **K_a** se calculan a partir de datos experimentales por análisis de regresión por mínimos cuadrados y se usan para calcular los diferentes parámetros farmacocinéticos asociados con el modelo bicompartimental, como indicamos a continuación. Los parámetros farmacocinéticos investigados tras la administración oral del fármaco tilosina A fueron:

A₁, A₂, A₃ Concentraciones del fármaco extrapoladas a tiempo 0.

α y β Constantes de disposición. Ambas son constantes híbridas y respectivamente gobiernan en conjunto los procesos de distribución del fármaco al compartimiento periférico, de retorno al central y de eliminación del mismo por biotransformación y excreción.

K_a Constante de absorción.

t_{1/2α} Semivida plasmática para la fase inicial de distribución (α).

t_{1/2β} Semivida plasmática para la fase terminal de eliminación (β).

t_{1/2a} Semivida plasmática de absorción.

AUC Área bajo la curva concentración vs tiempo

$$AUC = \frac{A_1}{\alpha} + \frac{A_2}{\beta} - \frac{A_3}{K_a}$$

CL Aclaramiento plasmático total (“Clearance”) *

$$CL = \frac{\text{Dosis} \times F}{AUC}$$

V₁ Volumen de distribución en el compartimiento central*

$$V_1 = (\text{dose kg}^{-1})(F) / A_1 + A_2$$

V₂ Volumen aparente de distribución en el compartimiento secundario*

$$V_2 = (V_1)(F) \times (K_{12}/K_{21})$$

K₁₂ Constante de distribución desde el compartimiento central al compartimiento periférico

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10}$$

K₂₁ Constante de retorno desde el compartimiento periférico al compartimiento central

$$K_{21} = \frac{(A_1 \beta K_a + A_2 \alpha K_a - A_3 \alpha \beta)}{A_1 (K_a - \alpha) + A_2 (K_a - \beta)}$$

K₁₀ Constante de eliminación.

$$K_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta}{K_{21}}$$

T_{max} Tiempo necesario para alcanzar la C_{max}.

C_{max} Concentración máxima en plasma tras administración oral.

* La biodisponibilidad (F) o fracción de dosis absorbida no fue calculada por falta del estudio tras administración intravenosa.

3.4. Fármacos y reactivos

- Acetonitrilo (CH₃CN; CAS: 75-05-8; SCHARLAU)
- Acetato de amonio (CH₃COONH₄; CAS: 631-61-8; MERCK)
- Ácido fórmico (H-COOH; CAS: 64-18-6; SCHARLAU)
- Hidrógenofosfato dipotásico (K₂HPO₄; CAS: 7778-77-0; MERCK)
- Dihidrógenofosfato potásico (KH₂PO₄; CAS: 7758-11-4; PANREAC)
- Metanol Grado HPLC (CH₃OH; CAS: 67-56-1; SCHARLAU)
- 2-Fenoxietanol (C₈H₁₀O₂; CAS: 122-99-6; PANREAC)

4. RESULTADOS

4.1. Farmacocinética de tilosina A tras administración única oral en truchas

(Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792)

4.1.1. Niveles plasmáticos de tilosina A tras administración única oral

Los niveles plasmáticos de tilosina A obtenidos en truchas tras la administración única oral de 40 mg tilosina/kg p.c. se representan en la Tabla 14. La Figura 8 ilustra los niveles plasmáticos medios de tilosina A frente al tiempo, calculados tras administración oral de 40 mg tilosina/kg p.c. en truchas.

Tabla 14. Niveles plasmáticos (µg/ml) de tilosina A tras administración única oral en pienso (40 mg tilosina/kg p.c.) en truchas

GRUPO 1 TRATADO								
TIEMPO (h)	ANIMALES (54 truchas) (n° identificación)	Tilosina A (µg/ml)						Valor medio (n=6) ± SD (µg/ml)
0,5	T1,T2,T3,T4,T5,T6	0,317	0,459	3,062	5,162	2,545	1,849	0,289 ± 0,073
1	T7,T8,T9,T10,T11,T12	0,260	0,373	3,767	5,667	3,489	1,190	0,407 ± 0,078
2	T13,T14,T15,T16,T17,T18	0,174	0,292	2,875	4,438	2,046	1,092	3,384 ± 0,468
4	T19,T20,T21,T22,T23,T24	0,264	0,383	2,945	5,779	3,076	0,966	5,135 ± 0,593
6	T25,T26,T27,T28,T29,T30	0,336	0,414	3,814	5,354	2,767	1,927	2,812 ± 0,491
8	T31,T32,T33,T34,T35,T36	0,385	0,521	3,842	4,409	2,949	2,050	1,512 ± 0,480
10	T37,T38,T39,T40,T41,T42	0,317	0,459	3,062	5,162	2,545	1,849	0,882 ± 0,133
12	T43,T44,T45,T46,T47,T48	0,260	0,373	3,767	5,667	3,489	1,190	0,756 ± 0,121
24	T49,T50,T51,T52,T53,T54	0,174	0,292	2,875	4,438	2,046	1,092	0,243 ± 0,036

SD: Desviación estándar

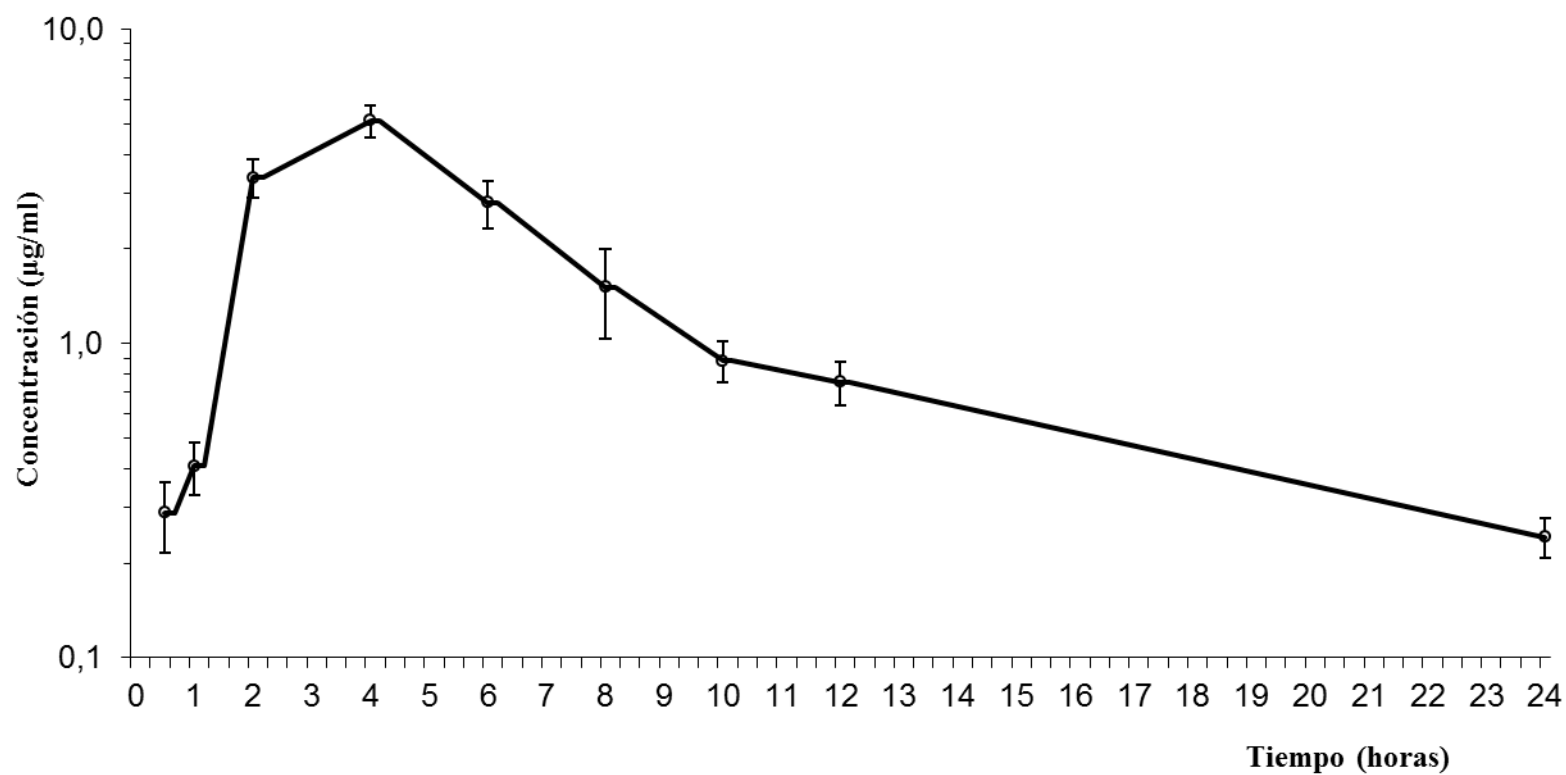


Figura 8. Niveles medios plasmáticos (µg/ml) de tilosina A tras administración única oral de 40 mg tilosina/kg p.c. en truchas. Cada punto representa el valor medio de 6 animales; las barras verticales corresponden a la desviación estándar

4.1.2. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras administración única oral

Los niveles plasmáticos de tilosina A vs tiempo obtenidos tras administración única oral de 40 mg tilosina/kg p.c. (Tabla 14), se fijaron secuencialmente a 1-, 2- y múltiple- modelo compartimental usando el programa Phoenix 32 Build 6.4.0.768 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) El modelo fue determinado por el mejor ajuste en base al valor más pequeño del Criterio de Información de Akaike (Yamaoka *et al.*, 1978). La curva de las concentraciones plasmáticas de tilosina A frente al tiempo tras administración única oral obtenida, se ajustó adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético de acuerdo a la siguiente ecuación exponencial:

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t} - A_3 \cdot e^{-K_a t}$$

donde C es la concentración plasmática de tilosina A; A_1 , A_2 y A_3 son coeficientes matemáticos; α es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución, β es la constante híbrida para la fase de eliminación terminal y K_a es la constante de velocidad de absorción, constante de primer orden. Los valores de los parámetros farmacocinéticos de la tilosina A calculados a partir de la administración única oral de 40 mg tilosina/ kg p.c. se presentan en la Tabla 15.

Tras la administración única oral de tilosina, se observó que el fármaco fue rápidamente absorbido y más lentamente eliminado obteniéndose una semivida de absorción ($t_{1/2a}$) de 1,526 h y alcanzando una concentración máxima (C_{max}) de 3,591 µg/ml en un tiempo (T_{max}) de 2,998 h. Tras la administración única oral de tilosina se observó un valor de la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de 5,897 h (Tabla 15).

La tilosina A tras su absorción oral presenta una óptima depuración sanguínea con un valor de aclaramiento plasmático (CL) de 1,088 l/h/kg tomando como biodisponibilidad el valor de 1, lo que se confirma con el valor de la razón K_{21}/K_{10} de 0,985.

Tabla 15. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras administración única oral en pienso (40 mg tilosina/kg p.c.) en truchas

Parámetro*	
A_1 (µg/ml)	19,52
A_2 (µg/ml)	3,629
A_3 (µg/ml)	23,149
α (h ⁻¹)	0,343
β (h ⁻¹)	0,117
K_a (h ⁻¹)	0,454
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,526
$t_{1/2\alpha}$ (h)	2,019
$t_{1/2\beta}$ (h)	5,897
K_{12} (h ⁻¹)	0,059
K_{21} (h ⁻¹)	0,199
K_{10} (h ⁻¹)	0,203
AUC (mg l ⁻¹ h)	36,748
C_{max} (µg/ml)	3,591
T_{max} (h)	2,998
K_{12}/K_{21}	0,297
K_{12}/K_{10}	0,291
K_{21}/K_{10}	0,985

* Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

4.2. Farmacocinética de tilosina A tras administración múltiple oral en truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

4.2.1. Niveles plasmáticos de tilosina A tras administración múltiple oral

Los niveles plasmáticos de tilosina A obtenidos en cada animal tras administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días consecutivos se presentan en la Tabla 16 y Tabla 17.

La Figura 9 ilustra los niveles plasmáticos medios de tilosina A vs tiempo, tras administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días consecutivos.

Tabla 16. Niveles plasmáticos (µg/ml) de tilosina A tras administración múltiple oral en pienso (40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos) en truchas

GRUPO 1 TRATADO								
Tiempo tras dosis D1,D2,D3,D4,D5 (h)	Tiempo acumulado tras la primera dosis (h)	Animales (180 truchas) (n° identificación)	Tilosina A (µg/ml)					
0,5 h-D1	0,5	T1,T2,T3,T4,T5,T6	0,317	0,260	0,174	0,264	0,336	0,385
1 h-D1	1	T7,T8,T9,T10,T11,T12	0,459	0,373	0,292	0,383	0,414	0,521
2 h-D1	2	T13,T14,T15,T16,T17,T18	3,062	3,767	2,875	2,945	3,814	3,842
4 h-D1	4	T19,T20,T21,T22,T23,T24	5,162	5,667	4,438	5,779	5,354	4,409
6 h-D1	6	T25,T26,T27,T28,T29,T30	2,545	3,489	2,046	3,076	2,767	2,949
8 h-D1	8	T31,T32,T33,T34,T35,T36	1,849	1,190	1,092	0,966	1,927	2,050
10 h-D1	10	T37,T38,T39,T40,T41,T42	1,116	0,896	0,829	0,765	0,762	0,925
12 h-D1	12	T43,T44,T45,T46,T47,T48	0,633	0,828	0,743	0,958	0,717	0,654
24 h-D1	24	T49,T50,T51,T52,T53,T54	0,258	0,309	0,225	0,218	0,225	0,221
4 h-D2	28	T55,T56,T57,T58,T59,T60	5,362	5,714	5,550	3,455	4,805	5,082
8 h-D2	32	T61,T62,T63,T64,T65,T66	3,597	2,125	2,144	3,559	3,221	4,036
12 h-D2	36	T67,T68,T69,T70,T71,T72	0,554	0,581	0,839	0,623	0,689	0,649
24 h-D2	48	T73,T74,T75,T76,T77,T78	0,179	0,288	0,379	0,293	0,228	0,286
4 h-D3	52	T79,T80,T81,T82,T83,T84	5,333	6,310	5,634	4,542	5,230	4,321
8h-D3	56	T85,T86,T87,T88,T89,T90	5,027	3,222	4,089	4,109	3,711	3,910
12 h-D3	60	T91,T92,T93,T94,T95,T96	0,925	0,735	0,793	0,831	0,808	0,774
24 h-D3	72	T97,T98,T99,T100,T101,T102	0,203	0,302	0,353	0,199	0,299	0,255
4 h-D4	76	T103,T104,T105,T106,T107,T108	4,805	6,429	6,229	4,696	5,648	5,945
8 h-D4	80	T109,T110,T111,T112,T113,T114	3,835	1,833	3,507	2,897	3,281	2,627
12 h-D4	84	T115,T116,T117,T118,T119,T120	0,879	0,610	0,767	0,776	0,759	0,897
24 h D4	96	T121,T122,T123,T124,T125,T126	0,249	0,309	0,205	0,317	0,293	0,255
0,5 h-D5	96,5	T127,T128,T129,T130,T131,T132	0,379	0,230	0,255	0,230	0,196	0,296
1 h-D5	97	T133,T134,T135,T136,T137,T138	0,622	0,472	0,439	0,639	0,326	0,360
2 h-D5	98	T139,T140,T141,T142,T143,T144	2,550	3,694	3,181	3,773	4,125	3,697
4 h-D5	100	T145,T146,T147,T148,T149,T150	5,381	6,214	5,510	4,790	5,909	4,121
6 h-D5	102	T151,T152,T153,T154,T155,T156	3,805	2,396	3,223	2,497	3,221	2,871
8 h-D5	104	T157,T158,T159,T160,T161,T162	1,285	1,181	1,703	1,125	1,514	1,597
10 h-D5	106	T163,T164,T165,T166,T167,T168	0,748	0,883	0,876	0,799	0,748	0,854
12 h-D5	108	T169,T170,T171,T172,T173,T174	0,631	0,705	0,752	0,718	0,880	0,701
24 h-D5	120	T175,T176,T177,T178,T179,T180	0,258	0,275	0,256	0,196	0,230	0,296

D1: día 1; D2: día 2; D3: día 3; D4: día 4; D5: día 5

Tabla 17. Niveles medios plasmáticos ($\mu\text{g/ml}$) de tilosina A tras administración múltiple oral en pienso (40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos) en truchas

GRUPO 1 TRATADO			
Tiempo tras dosis D1,D2,D3,D4,D5 (h)	Tiempo acumulado tras la primera dosis (h)	Animales (nº identificación)	Tilosina A($\mu\text{g/ml}$) Valor medio (n=6) \pm SD
0,5 h-D1	0,5	T1,T2,T3,T4,T5,T6	$0,289 \pm 0,073$
1 h-D1	1	T7,T8,T9,T10,T11,T12	$0,407 \pm 0,078$
2 h-D1	2	T13,T14,T15,T16,T17,T18	$3,384 \pm 0,468$
4 h-D1	4	T19,T20,T21,T22,T23,T24	$5,135 \pm 0,593$
6 h-D1	6	T25,T26,T27,T28,T29,T30	$2,812 \pm 0,491$
8 h-D1	8	T31,T32,T33,T34,T35,T36	$1,512 \pm 0,480$
10 h-D1	10	T37,T38,T39,T40,T41,T42	$0,882 \pm 0,133$
12 h-D1	12	T43,T44,T45,T46,T47,T48	$0,756 \pm 0,121$
24 h-D1	24	T49,T50,T51,T52,T53,T54	$0,243 \pm 0,036$
4 h-D2	28	T55,T56,T57,T58,T59,T60	$4,995 \pm 0,822$
8 h-D2	32	T61,T62,T63,T64,T65,T66	$3,114 \pm 0,802$
12 h-D2	36	T67,T68,T69,T70,T71,T72	$0,656 \pm 0,102$
24 h-D2	48	T73,T74,T75,T76,T77,T78	$0,276 \pm 0,067$
4 h-D3	52	T79,T80,T81,T82,T83,T84	$5,228 \pm 0,727$
8h-D3	56	T85,T86,T87,T88,T89,T90	$4,011 \pm 0,595$
12 h-D3	60	T91,T92,T93,T94,T95,T96	$0,811 \pm 0,065$
24 h-D3	72	T97,T98,T99,T100,T101,T102	$0,268 \pm 0,061$
4 h-D4	76	T103,T104,T105,T106,T107,T108	$5,625 \pm 0,728$
8 h-D4	80	T109,T110,T111,T112,T113,T114	$2,997 \pm 0,713$
12 h-D4	84	T115,T116,T117,T118,T119,T120	$0,781 \pm 0,103$
24 h D4	96	T121,T122,T123,T124,T125,T126	$0,271 \pm 0,043$
0,5 h-D5	96,5	T127,T128,T129,T130,T131,T132	$0,264 \pm 0,065$
1 h-D5	97	T133,T134,T135,T136,T137,T138	$0,476 \pm 0,131$
2 h-D5	98	T139,T140,T141,T142,T143,T144	$3,503 \pm 0,556$
4 h-D5	100	T145,T146,T147,T148,T149,T150	$5,321 \pm 0,762$
6 h-D5	102	T151,T152,T153,T154,T155,T156	$3,002 \pm 0,526$
8 h-D5	104	T157,T158,T159,T160,T161,T162	$1,401 \pm 0,237$
10 h-D5	106	T163,T164,T165,T166,T167,T168	$0,818 \pm 0,062$
12 h-D5	108	T169,T170,T171,T172,T173,T174	$0,731 \pm 0,083$
24 h-D5	120	T175,T176,T177,T178,T179,T180	$0,252 \pm 0,035$

D1: día 1; D2: día 2; D3: día 3; D4: día 4; D5: día 5; SD: desviación estándar

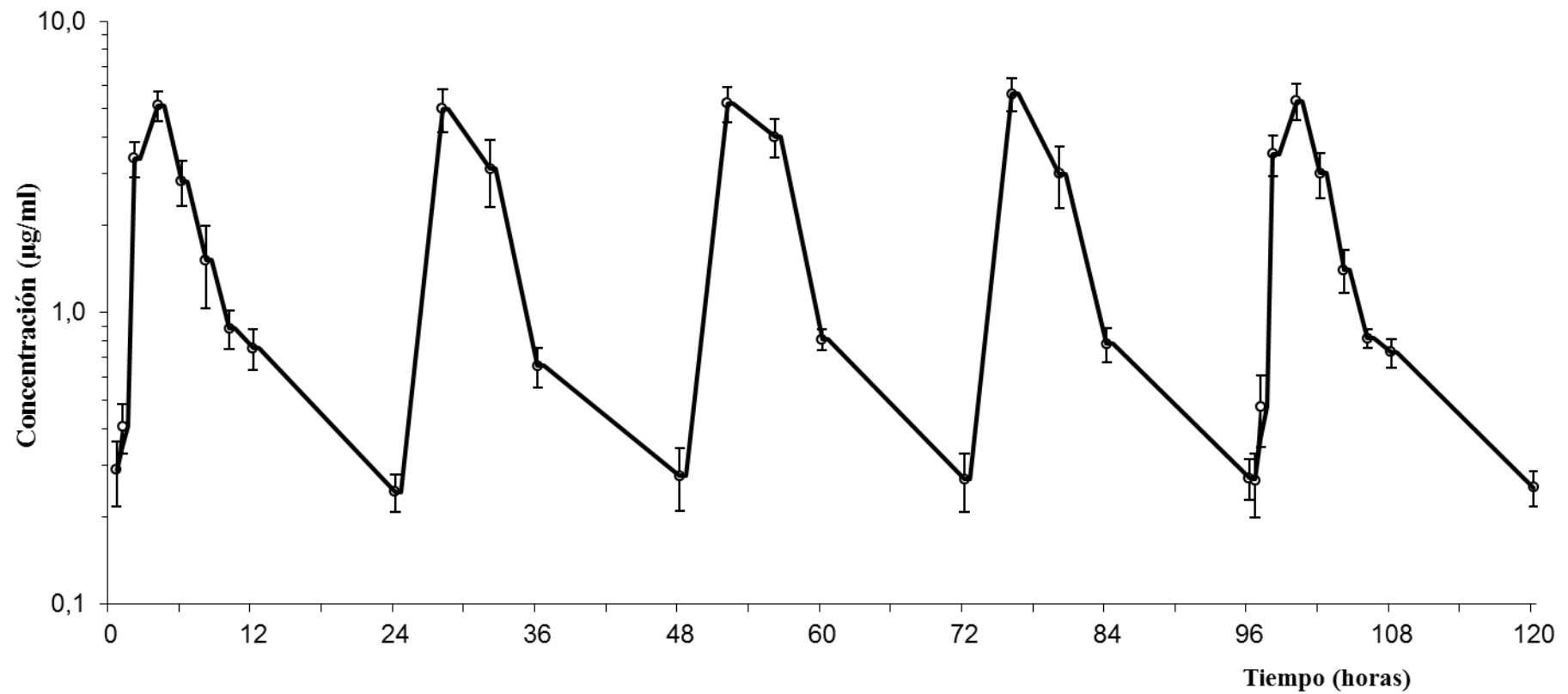


Figura 9. Niveles medios plasmáticos (µg/ml) de tilosina A tras administración múltiple oral en pienso (40 mg tilosina/ kg p.c./día durante 5 días consecutivos) en truchas. Cada punto representa el valor medio de 6 animales; las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

4.2.2. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras administración múltiple oral

Los niveles medios plasmáticos de tilosina A obtenidos tras administración múltiple oral en pienso de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos se fijaron secuencialmente a 1-, 2- y múltiple- modelo compartimental usando el programa WinNonlin (Version 5.0.1; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). El modelo fue determinado por el mejor ajuste en base al valor más pequeño del Criterio de Información de Akaike (Yamaoka *et al.*, 1978). Las curvas de disposición plasmática de tilosina A tras administración oral múltiple se ajustaron adecuadamente a un modelo bicompartimental para su análisis cinético de acuerdo a la siguiente ecuación exponencial:

$$C = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t} - A_3 \cdot e^{-K_a t}$$

donde C es la concentración plasmática de tilosina A ; A_1 , A_2 y A_3 son coeficientes matemáticos; α es la constante híbrida de velocidad para la fase de distribución, β es la constante híbrida para la fase de eliminación terminal y K_a es la constante de velocidad de absorción, constante de primer orden.

Los parámetros farmacocinéticos estimados tras el primer día (D1) de administración (40 mg tilosina/kg p.c) así como también aquellos obtenidos tras la última administración (D5) (es decir, tras administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días) se presentan en las Tabla 18 y Tabla 19, respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos estimados para todo el periodo completo de dosis múltiple oral (5 días) se presentan en la Tabla 20.

Los parámetros farmacocinéticos de tilosina A obtenidos a partir de los niveles medios plasmáticos tras la administración oral para el primer día de dosificación, para el quinto día de dosificación y para el periodo completo de dosificación se representan en la Tabla 21.

Tabla 18. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras el primer día (1ª dosis) de la administración oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, en truchas

GRUPO 1 TRATADO	
Primer día de administración (54 truchas)	
Parámetro*	
A_1 (µg/ml)	19,52
A_2 (µg/ml)	3,629
A_3 (µg/ml)	23,149
α (h ⁻¹)	0,343
β (h ⁻¹)	0,117
K_a (h ⁻¹)	0,454
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,526
$t_{1/2\beta}$ (h)	2,019
$t_{1/2\beta}$ (h)	5,897
K_{12} (h ⁻¹)	0,059
K_{21} (h ⁻¹)	0,199
K_{10} (h ⁻¹)	0,203
AUC (mg l ⁻¹ h)	36,748
C_{max} (µg/ml)	3,591
T_{max} (h)	2,998

* Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

Tabla 19. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras el quinto día (5ª dosis) de la administración oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, en truchas

GRUPO 1 TRATADO Quinto día de administración (54 truchas)	
Parámetro*	
A ₁ (µg/ml)	17,117
A ₂ (µg/ml)	3,578
A ₃ (µg/ml)	20,695
α (h ⁻¹)	0,395
β (h ⁻¹)	0,113
K _a (h ⁻¹)	0,520
t _{½ a} (h)	1,334
t _{½ α} (h)	1,756
t _{½ β} (h)	6,110
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,084
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,227
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,197
AUC (mg l ⁻¹ h)	35,078
C _{max} (µg/ml)	2,743
T _{max} (h)	5,048

*parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

Tabla 20. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras la administración múltiple oral en pienso (40 mg tilosina/kg p.c./día, durante cinco días consecutivos) en truchas

GRUPO 1 TRATADO periodo completo de dosificación (5 días) (180 truchas)	
Parámetro*	
A_1 ($\mu\text{g/ml}$)	19,461
A_2 ($\mu\text{g/ml}$)	3,741
A_3 ($\mu\text{g/ml}$)	23,202
α (h^{-1})	0,358
β (h^{-1})	0,124
K_a (h^{-1})	0,502
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,380
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,934
$t_{1/2\beta}$ (h)	5,569
K_{12} (h^{-1})	0,060
K_{21} (h^{-1})	0,203
K_{10} (h^{-1})	0,220
AUC ($\text{mg l}^{-1}\text{h}$)	38,150
C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	4,087
T_{\max} (h)	2,740

*parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos de tilosina A tras el primer día de tratamiento (D1), tras el quinto día de tratamiento (D5) y tras el periodo completo (5días) de la administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, en truchas

GRUPO 1 TRATADO			
Parámetro*	Primera administración (D1) (54 truchas)	Quinta administración (D5) (54 truchas)	Periodo completo de dosificación (5 días consecutivos) (180 truchas)
A ₁ (µg/ml)	19,52	17,117	19,461
A ₂ (µg/ml)	3,629	3,578	3,741
A ₃ (µg/ml)	23,149	20,695	23,202
α (h ⁻¹)	0,343	0,395	0,358
β (h ⁻¹)	0,117	0,113	0,124
K _a (h ⁻¹)	0,454	0,520	0,502
t _{1/2 a} (h)	1,526	1,334	1,380
t _{1/2 α} (h)	2,019	1,756	1,934
t _{1/2 β} (h)	5,897	6,110	5,569
K ₁₂ (h ⁻¹)	0,059	0,084	0,060
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,199	0,227	0,203
K ₁₀ (h ⁻¹)	0,203	0,197	0,220
AUC (mg l ⁻¹ h)	36,748	35,078	38,150
C _{max} (µg/ml)	3,591	2,743	4,087
T _{max} (h)	2,998	5,048	2,740

D1: día 1; D5: día 5

*Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la curva de niveles medios plasmáticos vs tiempo

Los parámetros $t_{1/2\beta}$ y AUC fueron similares en el primer día, quinto día y periodo completo de tratamiento, por lo que se demuestra que el tratamiento prolongado no origina acumulación del fármaco, ni tampoco una saturación en su proceso de eliminación. La semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) tras el primer día de tratamiento alcanza valores de 5,897 h y tras el quinto día de tratamiento 6,110 h, algo más prolongado pero no estadísticamente significativo por la variabilidad en los niveles plasmáticos a las 24 h (valores de 0,179/ 0,288/ 0,379/ 0,293/ 0,228/ 0,286 con un valor medio de $0,243 \pm 0,036$ a las 24 h tras la primera dosis frente a 0,258/ 0,275/ 0,256/ 0,196/ 0,230/ 0,296 con un valor medio de $0,252 \pm 0,035$ a las 24 h tras la quinta dosis).

Analizando los resultados presentados en la Tabla 21 que recoge los parámetros obtenidos tras el periodo completo de administración oral múltiple (40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos), se puede concluir :

- La tilosina se absorbe rápidamente con una semivida de absorción $t_{1/2a}$ de 1,380 h obteniéndose una concentración máxima (C_{max}) de 4,087 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de 2,740 h.
- Una vez en circulación sistémica, la tilosina se distribuye a nivel corporal y se elimina más lentamente del organismo, siendo la semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de 5,570 h.
- 24 horas post administración se detectan concentraciones plasmáticas en un rango de 0,179 a 0,379 $\mu\text{g/ml}$.

4.3. Distribución y depleción tisular de tilosina A tras administración múltiple oral en truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

Tras la administración múltiple oral en pienso de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días consecutivos, en las truchas tratadas se detectó la presencia de tilosina A (residuo marcador, a efectos del cálculo del tiempo de retirada, según la normativa de la Unión Europea) en músculo + piel en proporciones naturales, a diferentes periodos de tiempo tras el tratamiento. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 22.

Tabla 22. Niveles tisulares medios ($\mu\text{g/kg}$) de tilosina A tras administración múltiple oral en pienso (40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días) en truchas

Tiempo tras la última dosis	GRUPO 2 TRATADO (49 truchas)		
	Animales (49 truchas) (nº identificación)	Músculo + piel	Tilosina A (ng/g) Valor medio \pm SD (n=7)
		Tilosina A (ng/g)	
3 horas (0,125 días)	P1	570,000	438,57 \pm 165,21
	P2	519,040	
	P3	403,146	
	P4	290,563	
	P5	258,278	
	P6	323,675	
	P7	705,298	
24 horas (1 día)	P8	150,662	130,45 \pm 26,27
	P9	172,250	
	P10	146,523	
	P11	105,960	
	P12	110,927	
	P13	122,517	
	P14	104,305	
72 horas (3días)	P15	26,490	27,43 \pm 21,83
	P16	43,874	
	P17	68,709	
	P18	20,695	
	P19	11,762	
	P20	10,159	
	P21	10,282	
120 horas (5días)	P22	-	< LOQ
	P23	-	
	P24	-	
	P25	-	
	P26	-	
	P27	-	
	P28	-	
168 horas (7días)	P29	-	< LOQ
	P30	-	
	P31	-	
	P32	-	
	P33	-	
	P34	-	
	P35	-	

Tiempo tras la última dosis	GRUPO 2 TRATADO (49 truchas)		
	Animal (nº identificación)	Músculo + piel	Tilosina A (ng/g) Valor medio \pm SD (n=7)
		Tilosina A (ng/g)	
240 horas (10días)	P36	-	< LOQ
	P37	-	
	P38	-	
	P39	-	
	P40	-	
	P41	-	
	P42	-	
336 horas (14días)	P43	-	< LOQ
	P44	-	
	P45	-	
	P46	-	
	P47	-	
	P48	-	
	P49	-	

Para considerar la influencia de la temperatura del agua en las funciones fisiológicas y/o metabolismo de los peces y consecuentemente en la depleción de fármacos, en los estudios de depleción de residuos la legislación europea obliga expresar el tiempo transcurrido tras la dosificación como grados-día (EMA, 2008). Los grados-día se obtienen multiplicando la media diaria de las temperaturas del agua (en nuestro experimento 18 °C) por los días transcurridos tras la dosificación del fármaco (en nuestro experimento evaluamos la concentración del residuo marcador tilosina A durante 14 días tras tratamiento). La Tabla 23 presenta los residuos de tilosina A encontrados en el tejido diana músculo + piel tras la retirada del tratamiento de tilosina (40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días consecutivos) en truchas.

Tabla 23. Niveles medios en musculo + piel de tilosina A (ng/g) ($\mu\text{g/kg}$) tras administración múltiple oral en pienso de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días en truchas (7 animales/tiempo de retirada).

Tratamiento: 40 mg tilosina /kg p.c./día, 5 días		Músculo + piel
Días tras la última dosis	°C-Día	Tilosina A Valor medio (ng/g) \pm DS (n = 7)
0,125	2,25	438,57 \pm 165,21
1	18	130,45 \pm 26,27
3	54	27,43 \pm 21,83
5	90	<LOQ
7	126	<LOQ
10	180	<LOQ
14	252	<LOQ

Las concentraciones medias de tilosina A en músculo + piel en proporciones naturales se representan también mediante gráfico de líneas y de barras en las Figuras 10 y 11.

Estos resultados demuestran que la tilosina posee una buena distribución tisular. A las 3 horas (0,125 días) tras la última administración oral en pienso de 40 mg tilosina/kg p.c./día, la concentración media de tilosina A encontrada en el tejido músculo + piel alcanzó valores de 438,57 \pm 165,21 ng/g. A las 24 horas (1 día) tras la administración oral de la última dosis de tilosina, es decir tras finalizar el tratamiento, los valores medios tisulares de tilosina A detectados declinaron, encontrándose concentraciones en el tejido músculo + piel de 130,45 \pm 26,27 ng/g. Transcurridos 3, 5, 7, 10 y 14 días después de finalizado el tratamiento, las concentraciones de tilosina A en el tejido músculo + piel disminuyeron considerablemente, detectándose concentraciones de 27,43 \pm 21,83 ng/g a los 3 días del tratamiento. A los 5, 7, 10 y 14 días después del tratamiento no se detectaron concentraciones de tilosina A en el tejido diana músculo + piel.

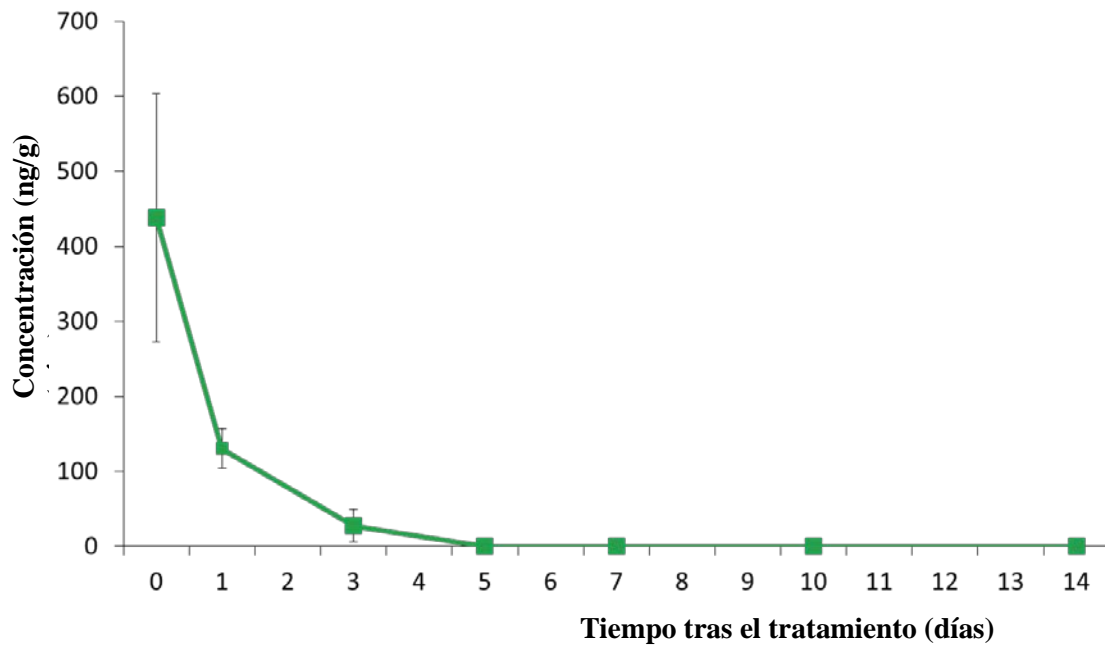


Figura 10. Depleción de residuos de tilosina A en músculo + piel de truchas tras administración múltiple oral en pienso de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días consecutivos

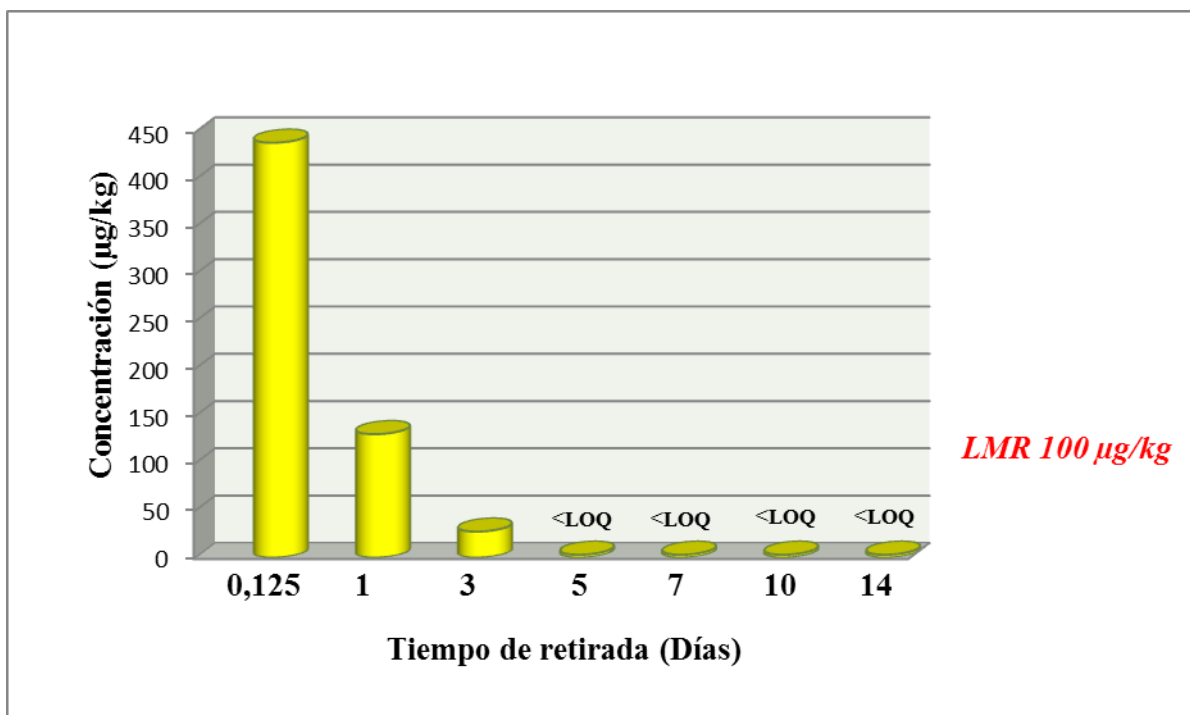


Figura 11. Depleción de residuos de tilosina A en músculo + piel de truchas tras administración múltiple oral en pienso de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días consecutivos

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, cuando un fármaco es administrado para propósitos terapéuticos en un animal productor de alimentos, como es el caso de la trucha, como medida de seguridad para el consumidor se exige establecer el tiempo de espera o periodo de retirada que hay que respetar previo al sacrificio del animal para consumo humano, para asegurar que los residuos en los tejidos estén por debajo de los LMR establecidos, como medida de salud pública.

Existen numerosos diseños experimentales y estadísticos para establecer el tiempo de espera o de retirada. La EMEA recomienda para la armonización de los tiempos de retirada que estos sean calculados mediante el uso de un programa de regresión lineal como método estadístico de elección (EMEA, 2002b). Usando este programa, el tiempo de espera o retirada se determina como el tiempo cuando el límite de tolerancia es del 95%, para que el residuo esté por debajo del LMR, con una confianza del 95%. La Unión Europea (UE) ha establecido un LMR para la tilosina (residuo marcador tilosina A) en peces de 100 ng/g para músculo + piel en proporciones naturales (Reglamento UE n° 37/2010 de la Comisión)

En el presente estudio en truchas, para determinar la depleción de tilosina A (residuo marcador), tras la administración múltiple oral en pienso de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días, hemos evaluado los resultados de los niveles de tilosina A obtenidos en el tejido diana musculo + piel (Tabla 23) y aplicando estos resultados en el programa estadístico de regresión lineal recomendado se establece un tiempo de espera de 2,68 días para asegurar el cumplimiento del LMR (Figuras 12 y 13).

results

FILE PRINT TMAX FACTOR

tilosinatrucha.wt

set MRL

95%
99%

Analyse

Plot Graph

Plot devs

Prob. Plot

SSTOT: 489253773378
SSPE: 433494127311
SSREG: 484588944513
SSLOF: 329887591295
ICPT: 414937434239
SLOPE: -100241103459
CORR: -931420271368
SXY: 495497031931

EXP No:
DATE:
SPECIES: trucha arcoiris
TISSUE: musculo+piel
NTOT: 21
GTOT: 3

F-TEST 1369794022387: [p>0.05]
COCHRAN-TEST 7511815802976: [0.01<p<0.05]
BARTLETT-TEST 8644409259603: [0.025>p>0.01]
SHAPIRO/WILK-TEST 9398918855997: [p>0.10]

MRL 100
Factor 1
Withdrawal time 2.679999999

Figura 12. Residuos de tilosina A en músculo + piel de truchas tras la administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días.

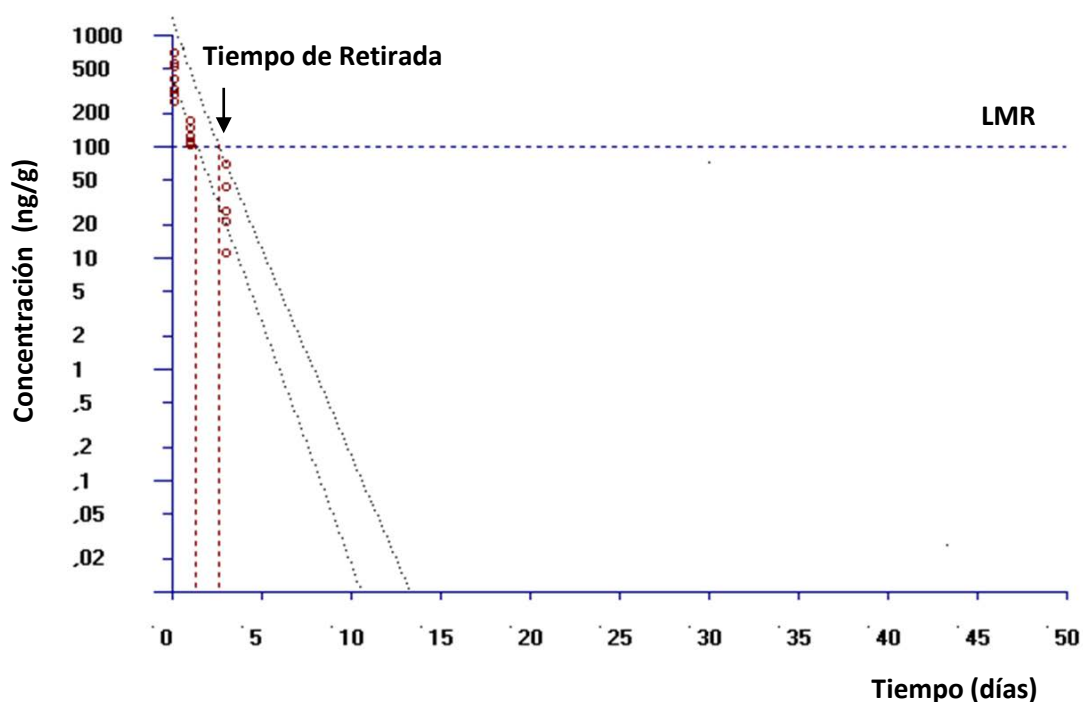


Figura 13. Residuos de tilosina A en músculo + piel en proporciones naturales de truchas tras la administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días. Datos generados usando el software de EMEA (EMEA, 2002). Resultados de la regresión lineal. Tiempo de espera (WT) resultante para músculo+piel.

En conclusión, en el presente estudio tras dosis oral múltiple de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días en truchas (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) se recomienda un tiempo de retirada del medicamento de 3 días (equivalente a 54°C-día) previo al sacrificio del animal destinado a consumo humano como medida de salud pública.

5. DISCUSIÓN

La alta densidad de peces que tienen las piscifactorías facilita la transferencia de enfermedades bacterianas, por lo que si no se tratan a tiempo puede originarse una gran pérdida económica por la mortalidad y/o un crecimiento reducido de los peces enfermos implicados. También, el uso inadecuado de los antibióticos en las piscifactorías puede causar riesgos potenciales por residuos de estos fármacos en los peces destinados a consumo humano e inducir resistencias a antibióticos en las bacterias; además, el uso de fármacos en las piscifactorías también puede originar impacto en el medio acuático.

Como desventaja a la óptima elección del régimen de dosificación, tenemos que resaltar que la dosis de los compuestos antimicrobianos en la práctica piscícola, a menudo, se extrapola de investigaciones llevadas a cabo en mamíferos, por existir limitados datos farmacocinéticos en especies acuáticas que soporten esta elección de dosis.

La tilosina es un antibiótico macrolido bacteriostático que supone una importante opción para el tratamiento frente a infecciones causadas por bacterias Gram-positivas, algunas Gram-negativas y diversas especies micoplasma patogénicos así como también con actividad anti-clamidea. El uso inadecuado puede llevar al desarrollo de resistencias bacterianas lo que podría provocar la retirada de este antibiótico del arsenal de fármacos veterinarios. Lo que es evidente es el número extremadamente limitado de agentes antimicrobianos autorizados en peces. Por lo tanto, se debe considerar en la propia especie animal de destino las características farmacocinéticas de este antibiótico combinadas con su susceptibilidad microbiológica en la elección de los tratamientos terapéuticos para maximizar la eficacia del fármaco y minimizar el desarrollo de resistencias bacterianas.

En diversas especies animales se han llevado a cabo estudios farmacocinéticos de la tilosina tras diversas vías de administración tales como en la rata (Carter *et al.*, 1987), en el perro (Weisel *et al.*, 1977), en ganado vacuno, ovino y caprino (Baggot y Gingerich, 1976; Gingerich *et al.*, 1977; Van Duyn y Folkerts, 1979; Burrows *et al.*, 1983; Atef *et al.*, 1991; Modric *et al.*, 1998; Taha *et al.*, 1999; Saurit *et al.*, 2002; Shaddad *et al.*, 2007), en équidos (Dowling *et al.*, 1995), en porcino (Prats *et al.*, 2002b; en aves (Yoshida *et al.*, 1973; Ziv, 1980; Locke *et al.*, 1982). Sin embargo, a nuestro conocimiento, no existe en la literatura una descripción de la farmacocinética del

macrólido tilosina en peces y dado su potencial de aplicabilidad en la industria acuícola, es necesario este conocimiento a efectos de su uso prudente que asegure eficacia en el tratamiento (mantenimiento en los fluidos y/o tejidos de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y seguridad para el consumidor (concentraciones de residuos en órganos diana menores del LMR). El propósito del presente trabajo fue obtener datos farmacocinéticos y de depleción de residuos para la tilosina en la trucha arco iris. El presente trabajo es el primero que describe la absorción, distribución y eliminación de la tilosina en la trucha arco iris.

La disposición de la tilosina tras administración oral única (40 mg/kg p.c.) y múltiple en pienso (40 mg/kg p.c./día, 5 días.) en truchas arco iris fue descrita adecuadamente mediante un modelo abierto bicompartimental, con una primera fase de distribución α , seguido de una segunda fase de eliminación β más lenta, dato similar al descrito en perros (Weisel *et al.*, 1977), en ganado ovino, caprino y vacuno (Gingerich *et al.*, 1977; Burrows *et al.*, 1983; Burrows *et al.*, 1986; Taha *et al.*, 1999) en porcino (Prats *et al.*, 2002).

La tilosina es una base orgánica que es extensivamente distribuida en el organismo corporal, alcanzando concentraciones tisulares que exceden a las concentraciones plasmáticas (Baggot y Gingerich, 1976). En nuestro estudio, en la trucha, tras la administración única oral de tilosina (40 mg/kg p.c.) se observó que el fármaco fue rápidamente absorbido con una semivida de absorción ($t_{1/2a}$) de 1,526 h y alcanzando una concentración máxima (C_{max}) de 3,591 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de 2,998 h. Tras administración múltiple oral (40 mg tilosina/kg p.c./día, 5 días) se obtuvo una concentración máxima (C_{max}) de 4,087 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de 2,740 h. Estos resultados son comparables a los obtenidos en perros (WHO, 1991), donde observaron que perros que reciben 25 mg tilosina/kg p.c. por vía oral, presentan una C_{max} de 2,7 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{max}) de 2 h. Sin embargo difieren de los resultados obtenidos en ganado porcino y en pollos (WHO, 1991) donde la administración oral de tilosina tartrato (30 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente) origina un C_{max} de 2,4 $\mu\text{g/ml}$ en porcino y un C_{max} de 1,2 $\mu\text{g/ml}$ en pollos, ambos en un tiempo (T_{max}) de 1,5 h, lo que evidencia que la tilosina en forma de tartrato es mejor absorbida a partir del trato alimentario de la trucha. En nuestro estudio no pudo calcularse la biodisponibilidad oral, por no haberse podido realizar el ensayo de administración intravenosa.

La tilosina una vez en circulación sanguínea se distribuye ampliamente por los tejidos. La tilosina es una base orgánica liposoluble ($pK_a = 7,1$) con un 40% de unión a proteínas, un alto grado de solubilidad lipídica y un bajo grado de ionización (Gingerich *et al.*, 1977). Por lo tanto se distribuye ampliamente en los tejidos y fluidos corporales. Las semividas de eliminación ($t_{1/2 \beta}$) de la tilosina calculadas tras la administración oral en la trucha (5,897 h tras administración oral única, 5,569 h tras administración múltiple oral) indican que esta dosis estudiada no presenta efectos de acumulación. La semivida de eliminación calculada en la trucha tras administración oral única o múltiple fue mayor que aquella descrita tras administración intravenosa para ratas, perros, ganado vacuno, ovino, caprino y porcino y para aves (Baggot y Gingerich 1976; Duthu, 1985; Burrows *et al.*, 1986; Weisel *et al.*, 1977; Locke *et al.*, 1982; Ziv y Sulman, 1973b; Atef *et al.*, 1991; Taha *et al.*, 1999; Prats *et al.*, 2002). La $t_{1/2 \beta}$ en estas especies alcanza valores en un rango de 0,9 h en ratas a 4,7 h en ganado ovino. Este resultado podría sugerir un efecto de circulación entero-hepática, y/o también que el fármaco una vez en los tejidos estos serviría como reservorios para el fármaco, un fenómeno característico de los antibióticos macrólidos (Burrows *et al.*, 1983; 1986). El valor de la constante de eliminación K_{10} ($0,220 \text{ h}^{-1}$), K_{12} ($0,060 \text{ h}^{-1}$) y K_{21} ($0,203 \text{ h}^{-1}$) indica una lenta distribución de la tilosina entre los compartimentos corporales.

La dosificación elegida en el presente estudio de 40 mg tilosina/kg p.c./día durante 5 días es superior a las dosis de tilosina que se utilizan en otros animales productores de alimentos (de 2 a 10 mg/kg/día, vía intramuscular en ganado vacuno y porcino, y de 25-35 mg/kg p.c. vía oral en agua de bebida para porcino y pollos, respectivamente) (EMEA 1997), obteniendo una concentración máxima (C_{\max}) de 4,087 $\mu\text{g/ml}$ en un tiempo (T_{\max}) de 2,740 h, concentración máxima plasmática mayor que las MIC eficaces para patógenos comunes tales como *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. (MIC 0,4 $\mu\text{g/ml}$), *Mycoplasma* (MIC 0,80 $\mu\text{g/ml}$) (Drews *et al.*, 1975; Prescott y Baggot, 1991). Si además tenemos en cuenta que a las 12 y 24 horas post administración se detectan concentraciones plasmáticas en un rango de 0,633 a 0,958 $\mu\text{g/ml}$ y de 0,225 a 0,309 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente y que el AUC presenta valores de 35,078 $\text{mg l}^{-1}\text{h}$, también son datos farmacocinéticos apropiados para predecir una eficacia.

El denominado modelo farmacocinético (PK) / farmacodinámico (PD) es una herramienta versátil que principalmente se utiliza para seleccionar los regímenes de dosis (dosis e intervalo), para confirmarlo posteriormente en un ensayo clínico. En el modelo PK/PD el perfil de concentración plasmática juega un papel importante para predecir el efecto. Tradicionalmente los valores claves de PK propuestos son la C_{max} y el AUC y para PD en el caso de un antibiótico la CMI. El modelo PK/PD habitualmente se estudia en paralelo durante el desarrollo del medicamento, sin embargo para el caso de medicamentos en peces existe información muy limitada de estos estudios. El objetivo final del modelo PK/PD es el uso racional del antibiótico bajo dos premisas: (1) optimizar la eficacia clínica y (2) minimizar la selección y la transferencia de patógenos resistentes (Lees y Aliabadi, 2002; Toutain *et al.*, 2002). En general, parece ser suficiente para predecir una eficacia la razón C_{max}/CMI como índice seleccionado para aminoglucósidos y el índice $T > CMI$ (el tiempo durante el cuál la concentración plasmática excede a la CMI, expresado como un porcentaje de intervalo de dosis) índice seleccionado para los antibióticos tiempo-dependientes, tales como β -lactámicos y macrólidos. Los índices AUC/CMI , C_{max}/CMI y $T > CMI$ son índices PK/PD de eficacia porque son implícitos de la farmacocinética y el parámetro PD común es la CMI, es decir, son parámetros que implican la disposición cinética del fármaco y la susceptibilidad microbiológica (Hyatt *et al.*, 1995; Schentag, 1989). Se debe resaltar que estos índices PK/PD predictivos de eficacia *in vivo* se calculan a partir de las concentraciones del antibiótico libre en plasma, no del nivel total tisular del antibiótico. Además, la mayoría de los patógenos de interés clínico se localizan extracelularmente y la biofase para el antibiótico es el fluido extracelular (Schentag, 1989). Sin embargo, si los patógenos son intracelulares o si existe una barrera para la difusión del antibiótico, la concentración plasmática puede ser menos útil para predecir las concentraciones en el lugar de infección. En general, los tres índices anteriormente mencionados se utilizan para una eficacia clínica con la erradicación bacteriana, aunque es necesario chequear su validez clínica.

Asumiendo la validez de estos índices, son valores críticos necesarios para predecir una eficacia bacteriana aunque por el momento aún no son índices firmemente validados en medicina veterinaria, por ello los resultados obtenidos son muy óptimos para iniciar el diseño del régimen de dosis para el tratamiento de un fármaco en una especie animal específica.

Para el caso de los macrólidos clasificados como fármacos co-dependientes (la acción antibiótica depende de la duración de exposición y de la concentración mantenida por el fármaco), por lo tanto para predecir la eficacia se recomienda utilizar principalmente el índice AUC/CMI y también es útil el índice $T > CMI$ (la CMI puede ser examinada con sistemas *in vitro* mimetizando la concentración esperada del antibiótico *in vivo*) (Murakawa *et al.*, 1980). Aunque sería más precisa la utilización de la CMI_{90} , el valor estándar más computable es la CMI_{50} , valor también sugerido como razonable para evitar la administración de excesivas altas dosis de antibióticos (Schentag, 2000)

Los datos descritos en la literatura recomiendan valores de AUC/CMI entre 25 y 50 y de $T > CMI$ entre el 40% y el 50% de intervalo, valores principalmente contrastados para antibióticos macrólidos (Drusano y Craig, 1997; Craig, 1998; Jacobs *et al.*, 1999). La tilosina presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a la mayoría de patógenos que afectan a los peces. Tomando valores de CMI_{50} de 1 $\mu\text{g/ml}$ y tomando el parámetros cinético AUC de tilosina calculado en nuestro estudio (40 mg/kg p.c./día, 5 días) se puede anticipar una razón AUC/CMI de ≥ 25 . Con respecto al índice $T > CMI_{50}$ se encontraría durante mas del 50% del intervalo de dosis.

Sobre la base de los resultados de este estudio se puede sugerir que la tilosina administrada vía pienso en la trucha arco iris en cultivo a una temperatura de agua de 18 °C se debe utilizar para una eficacia clínica a una dosis de 40 mg/kg p.c./día durante 5 días, aconsejándose no utilizar nunca dosis menores para minimizar el desarrollo de resistencias antimicrobianas.

En medicina veterinaria, cuando la tilosina se administra con fines terapéuticos, es importante, desde el punto de vista de la salud pública, conocer su persistencia en los tejidos de animales de consumo humano. Para ello, la legislación contempla como parámetros de seguridad alimentaria para el consumidor el tiempo de espera o periodo de retirada del medicamento previo al sacrificio del animal, periodo de tiempo necesario para asegurar que los residuos estén por debajo de los LMR establecidos. Existen numerosos diseños experimentales y métodos estadísticos para establecer el tiempo de espera. La EMEA recomienda el uso de un método estadístico de regresión lineal, como método de elección (EMEA, 2002). Usando este método, el tiempo de espera se

determina como el tiempo, cuando el límite de tolerancia es del 95%, para que el residuo esté por debajo del LMR, con una confianza del 95%.

El Comité de Productos Veterinarios (CVMP) de la EMEA ha establecido los LMR para la tilosina en las distintas especies para consumo humano en las que se ha autorizado su uso. El LMR en peces establecidos en la actualidad es 100 µg/kg para músculo + piel en proporciones naturales, expresado como residuo marcador la tilosina A (REGLAMENTO (UE) n° 37/2010 de la Comisión).

En nuestro estudio, tomando como residuo marcador la tilosina A y utilizando el programa recomendado por la EMEA, obtenemos un tiempo de espera de 2,679 días, tras el régimen de dosificación de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos. En consecuencia, el tiempo de espera recomendado es de 3 días.

En resumen, la tilosina posee propiedades óptimas para el uso terapéutico frente a infecciones comunes en truchas, la dosificación recomendada para su administración vía pienso no debe ser inferior a 40 mg tilosina/kg p.c./día. Para una dosis oral 40 mg tilosina/kg p.c durante 5 días, un tiempo de espera de 3 días es necesario para asegurar que las concentraciones de residuos (tilosina A) en los tejidos sean menores que el LMR establecido por la UE.

6. CONCLUSIONES

1) Se ha estudiado en un conjunto de 249 truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) el comportamiento farmacocinético del antibiótico macrólido tilosina. Por el momento no se ha descrito el perfil cinético de este fármaco en peces. Nuestro estudio proporciona información detallada sobre el comportamiento farmacocinético de la tilosina tras administración oral única y múltiple en el pienso en truchas, así como también la depleción tisular de sus residuos. El antibiótico macrólido tilosina en forma de tartrato (AF1300 Tylan soluble) fue donado por Eli Lilly and Company Limited, Liverpool L24 9LN (con una pureza de 93,1% de tilosina A, y 97,1% de tilosina A+B+C+D). El medicamento AF1300 Tylan soluble fue suministrado a su vez a la empresa Trow España, S.A. (Skretting, Burgos) para la fabricación del pienso medicado.

2) Para realizar el estudio farmacocinético, se ha desarrollado y validado un método rápido y sencillo para la determinación de tilosina A (mayor componente del medicamento) en plasma sanguíneo y en el tejido músculo + piel en condiciones naturales de trucha arco iris. La validación del método se ha realizado conforme a los criterios fijados por la EMEA de sensibilidad, linealidad, recuperación, exactitud, precisión, robustez y estabilidad. En todos los casos se han obtenido resultados satisfactorios acordes con las exigencias de la EMEA.

3) El estudio farmacocinético recoge tres investigaciones:

- a. Se ha evaluado la curva concentración plasmática-tiempo y los parámetros farmacocinéticos correspondientes de la tilosina A tras dosis única oral, vía pienso medicado, de 40 mg tilosina/kg p.c., a una temperatura del agua de 18 °C.
- b. Se ha evaluado la curva concentración plasmática-tiempo y los parámetros farmacocinéticos correspondientes de la tilosina A tras dosis múltiple oral, vía pienso medicado, de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días consecutivos, a una temperatura del agua de 18 °C.
- c. Se han evaluado las concentraciones de tilosina A en el tejido músculo + piel en proporciones naturales, tras la administración oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días, a una temperatura del agua de 18 °C y se

ha calculado el tiempo de espera o de retirada como parámetro de seguridad para el consumidor.

4) La curva de niveles medios plasmáticos-tiempo de tilosina A encontrada experimentalmente en truchas tras la administración de dosis única oral, vía pienso medicado, 40 mg tilosina/kg p.c., se ajusta adecuadamente a un modelo abierto bicompartimental para su análisis cinético, obteniéndose la siguiente ecuación exponencial:

$$C_p = 19,52 \times e^{-0,343t} + 3,629 \times e^{-0,117t} - 23,149 \times e^{-0,454t}$$

5) En truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), la tilosina se absorbe tras administración de dosis única oral de 40 mg tilosina/kg p.c., con una semivida plasmática de absorción ($t_{1/2a}$) de 1,526 h; alcanzándose una concentración máxima plasmática (C_{max}) de 3,591 µg/ml en un tiempo (T_{max}) de 2,998 h. Tras su absorción, la tilosina se distribuye con una semivida plasmática de distribución ($t_{1/2\alpha}$) de 2,019 h seguido de una eliminación más lenta con una semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de 5,897 h.

6) En truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), la tilosina tras la administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días, no presenta acumulación y/o saturación en base a los parámetros de absorción C_{max} y AUC y también en base a la semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) en comparación con los valores de estos parámetros obtenidos tras la administración de dosis única.

7) Tras la administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, 5 días, se obtuvo una semivida plasmática de absorción ($t_{1/2a}$) de 1,380 h, una concentración plasmática máxima (C_{max}) de 4,087 µg/ml en un tiempo (T_{max}) de 2,740 h. Tras la administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días, la tilosina se elimina más lentamente del organismo, siendo la semivida plasmática de eliminación ($t_{1/2\beta}$) de 5,569 h, detectándose en los animales tratados niveles plasmáticos del antimicrobiano en un rango de 0,633 a 0,958 µg/ml y de 0,225 a 0,309 µg/ml a las 12 h y 24 h tras la última dosis, respectivamente.

8) El estudio de distribución y depleción tisular demuestra que la tilosina tras la administración múltiple oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, 5 días, se distribuye ampliamente encontrándose concentraciones altas de tilosina A a las 3 h después de la

última dosis en músculo + piel en proporciones naturales (438,57 ng/g). Transcurridos 1 y 3 días después de la última dosis, se demuestra una depleción de estos residuos, detectándose concentraciones en músculo + piel de 27,43 ng/g a los 3 días después de la última dosis, e inferiores al LOQ a los 5, 7, 10 y 14 días tras la última dosis.

9) Considerando el residuo marcador fijado, tilosina A, y tras aplicar el análisis estadístico de regresión lineal recomendado por la EMEA para calcular el tiempo de retirada, en nuestro estudio obtenemos un tiempo de retirada o de espera de 2,679 días para músculo + piel en proporciones naturales para asegurar el cumplimiento del LMR (100 ng/g).

10) En función de los resultados de nuestro estudio farmacocinético, teniendo en cuenta la relación PK/PD, y la depleción de residuos, finalmente se sugiere que en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), un régimen de dosificación oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días, podría ser de valor terapéutico en truchas frente a infecciones comunes por patógenos susceptibles a tilosina, aconsejándose no utilizar nunca dosis menores para minimizar el desarrollo de resistencias antimicrobianas.

11) Para este régimen de dosificación oral de 40 mg tilosina/kg p.c./día, durante 5 días, se recomienda para la protección del consumidor como medida de salud pública un tiempo de retirada o de espera de 3 días, previo al sacrificio del animal destinado a consumo, periodo de tiempo que aseguraría que las concentraciones de residuos en el tejido estudiado (músculo + piel en proporciones naturales) fueran menores que el LMR establecido por la Unión Europea para esta especie acuícola de consumo.

7. BIBLIOGRAFÍA

ABDUL-KARIM, B.G. (2006a). Study No. T1G1010402. Pre-clinical laboratory study: pharmacokinetics of tylosin in cattle and calves. Elanco Animal Health, A Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

ABDUL-KARIM, B.G. (2006b). Study No. T1G1010403. Pre-clinical laboratory study: pharmacokinetics of tylosin in chicken. Elanco Animal Health, a Division of Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

AGNOLETTI, F., FERRO, T., GUOLO, A., MARCON, B., COCCHI, M., DRIGO, I., MAZZOLINI, E. & BANO, L. (2009). A survey of *Clostridium spiroforme* antimicrobial susceptibility in rabbit breeding. *Veterinary Microbiology* **136**, 188–191.

AL-MOMANI, W., NICHOLAS, R.A.J., JANAKAT, S., ABU-BASHA, E. & AYLING, R.D. (2006). The in vitro effect of six antimicrobials against *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* LC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum* isolated from sheep and goats in Jordan. *Tropical Animal Health and Production* **38**, 1–7.

ALFREDSON, D.A. & V. KOROLIK (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters* **277**(2), 123-132.

AL-WABEL, N.A. (2008). The pharmacokinetics and milk residual behaviour of tylosin in lactating Najdi ewes. *Iranian Journal of Veterinary Research* **9** (2), 138-143.

ANADÓN, A. & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science* **59**, 183-198.

ANDERSON, R.C. (1960) Tylosin absorption and excretion studies. Unpublished report No. 893/FAANIM/AM from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

ANDERSON, R.C. & WORTH, H.M. (1961). The acute toxicity of tylosin phosphate. Study No. 893/TACUTE/AM. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Co, Indianapolis, Indiana, USA.

ANDERSON, R.C., HARRIS, P.N., LEE, C.C., MAZE, N., SMALL, R.M. & WORTH, H.M. (1966a). The toxicology and pharmacology of tylosin, an antibiotic, and some salts of tylosin. Study No. VAR.100/c/9. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Co, Indianapolis, Indiana, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health.

ANDERSON, R.C., WORTH, H.M., SMALL, R.M. & HARRIS, P.N. (1966b). Toxicological studies on tylosin: its safety as a food additive. *Food and Cosmetics Toxicology* **4**, 1-15.

ARRET, B., JOHNSON, D.P. & KIRSHBAUM, A. (1971). Outline of details for microbiological assays of antibiotics: Second revision. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **60**, 1689-1694.

ATEF, M., ABO EL-SOUD, K., NAHED, E. & TAWFIK, M. (1999). Elimination of tilmicosin in lactating ewes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **106**, 291-294.

ATEF, M., YOUSSEF, S.A., ATTA, AH & EL-MAAZ, A.A. (1991). Disposition of tylosin in goats. *British Veterinary Journal* **147**, 207-215.

AWJI, E.G., DAMTE, D., LEE, S., LEE, J., KIM, Y. & PARK, S. (2012). The in vitro activity of 15 antimicrobial agents against bacterial isolates from dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* **74** (8), 1091–1094.

BAGGOT, J. D. (1974). Principles of Drug Distribution. *Australian Veterinary Journal* **50**, 111-119.

BAGGOT, J.D. (1977). Principles of drug disposition: the basis of veterinary clinical pharmacology. 1st Ed., Philadelphia, W. B. Saunders Co., PA. pp 1-34.

BAGGOT, J.D. (1978). Some aspects of clinical pharmacokinetics in veterinary medicine: principles of pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **1**, 111-118.

- BAGGOT, J.D. & GINGERICH, D.A. (1976). Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of a single dose to cows. *Research in Veterinary Science* **21**, 318-323.
- BALLOW, C.H. & AMSDEN, G.W. (1992). Azithromycin: the first azalide antibiotic. *The Annals of Pharmacotherapy Journal* **26** (10), 1253-1261.
- BALTZ, R.H. & SENO, E.T. (1988). Genetics of *Streptomyces fradiae* and tylosin biosynthesis. *Annual Review of Microbiology* **42**, 547-574.
- BALTZ, R.H., SENO, E.T., STONESIFER, J. & WILD, G.M. (1983). Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. A preferred pathway from tylactone to tylosin. *Journal of Antibiotics* **36**, 131-141.
- BARCIA-MACAY, M., SERAL, C., MINGEOT-LECLERCQ, M.P., TULKENS, P.M. & VAN BAMBEKE, F. (2006). Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50** (3), 841-851.
- BRANSON, E. (2003). Rainbow trout gastro-enteritis (RTGE): first diagnosis in the UK. *Fish Veterinary Journal* **7**, 71-76.
- BENNET, J.V., BRODIE, J.L., BENNER, E.J. & KIRBY, W.M.M. (1966). Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied Microbiology* **14**, 170-177.
- BERKMAN, R.N., BRANSCUM, A. & RICHARDS, E.A. (Undated). Tylosin residue studies in chickens. Experiment No. VPR-41-418. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana, USA. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.
- BERKMAN, R.N. & VAN DUYN, R.L. (Undated). Tylosin toxicity study in poultry. Unpublished study No. VPR-53-418 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

BONNIER, M., DORÉ, C., AMÉDÉO, J. & GUÉRIN-FAUBLÉE, V. (2006). In vitro activity of tylosin and tilmicosin against cocci isolated from bovine mastitis. *Revue de Médecine Vétérinaire* **157** (10), 486-489.

BRISSON-NOEL, A., TRIEU-CUOT, P. & COURVALIN, P. (1988). Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **22**, 13-23.

BRODDLE, W.D., GOSSETT, F.O., ADAMS, E.R., HOFFMAN, D.G., GRIES, C.L., GIBSON, W.R. & MORTON, D.M. (1978a). Chronic toxicity of tylosin fed to rats for one year. Unpublished study No. R-307 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

BRODDLE, W.D., GOSSETT, F.O., ADAMS, E.R., HOFFMAN, D.G., KITCHEN, D.N., GIBSON, W.R. & MORTON, D.M. (1978b). A study of a parental population of rats bred to produce offspring assigned to one- and two year dietary studies of tylosin. Unpublished study No. R-1176 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

BRYSKIER, A. (2000). Ketolides-telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **6** (12), 661-669.

BRYSKIER, A., AGOURIDAS, C. & GASC, J. (1993). Classification of macrolide antibiotics. In: Bryskier, A., Butzler, J.P., Neu, H.C., Tulkens, M.P., eds. *Macrolides: chemistry, pharmacology and clinical use*. Oxford, England: Blackwell, pp 5-66.

BRYSKIER, A. & BUTZLER, J.P. (2003). Macrolides. In: *Antibiotic and Chemotherapy: Anti-infective agents and their use in therapy*. Finch, R.G., Greenwood, D., Norrby, S.R. and Whitley, R.J. Edinburgh, Churchill Livingstone.

BURROWS, G.E. (1980). Pharmacotherapeutics of macrolides, lincomycins, and spectinomycin. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **176**, 1072-1077.

BURROWS, G.E., BARTO, P.B., MARTIN, B. & TRIPP, M.L. (1983). Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin and tylosin. *American Journal of Veterinary Research* **44**, 1053-1057.

BURROWS, G.E., BARTO, P.B. & MARTIN, B. (1986). Antibiotic disposition in experimental pneumonic pasteurellosis: gentamicin and tylosin. *Canadian Journal of Veterinary Research* **50**, 193-199.

CALDWELL, D.B., WANG, Y. & LIN, J. (2008). Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(11), 3947-3954.

CAMERON, D.M. (1990a). Tylosin (Tylan Soluble) dose tolerance study in broiler chickens. Unpublished study No. LLY 24/90799 from the Department of Animal Science, Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, England. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

CAMERON, D.M. (1990b). Tylosin (Tylan Soluble) dose tolerance study in turkeys. Unpublished study No. LLY 25/90800 from the Department of Animal Science, Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, England. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

CAMERON, D.M. (1990c). Tylosin (Tylan Soluble) dose tolerance study in pigs. Unpublished study No. LLY 22/90797 from the Department of Animal Science, Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, England. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

CAMERON, D.M. (1990d). Tylosin (Tylan Soluble) dose tolerance study in calves. Unpublished study No. LLY 23/90798 from the Department of Animal Science, Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, England. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

CARBON, C. (1998). Pharmacodynamics of Macrolides, Azalides and Streptogramins: Effect on Extracellular Pathogens. *Clinical Infectious Diseases* **27**, 28-32.

CARLETTI, M., GUSSON, F., ZAGHINI, A., DACASTO, M., MARVASI, L. & NEBBIA, C. (2003). In vitro formation of metabolic-intermediate cytochrome p450 complexes in rabbit liver microsomes by tiamulin and various macrolides. *Veterinary Research* **34**, 405-411.

CARLIER, M.B., ZENEBERGH, A. & TULKENS, P.M. (1987). Cellular uptake and subcellular distribution of roxthromycin and erythromycin in phagocytic cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **20**, 47-56.

CARTER, K.K., HIETALA, S., BROOKS, D.L. & BAGGOT, J.D. (1987). Tylosin concentrations in rat serum and lung tissue after administration in drinking water. *Laboratory Animal Science* **37**, 468-470.

CE, Comisión Europea (2015). Comunicación de la comisión. Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria (2015/C 299/04). *Diario Oficial de la Unión Europea* 7-23.

CESTER, C.C., GANIERE, J.P. & TOUTAIN, P.L. (1993). Effect of stage of oestrous cycle on tylosin disposition in genital tract secretions of cows. *Research in Veterinary Science* **54**, 32-39.

CHAMBERLAND, S. (1993). Intracellular accumulation of tylosin in primary swine and bovine alveolar macrophages. Unpublished study from the Département de Microbiologie, Centre de Recherche du CHUL, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

CHAN, W., GERHARDT, G.C. & SALISBURY, C.D.C. (1994). Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **77**, 331-333.

- CHERLET, M., DE BAERE, S., CROUBELS, S. & DE BACKER, P. (2002). Quantitation of tylosin in swine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **473**, 167-175.
- CHOI, C., HAM, H., KWON, D., KIM, J., CHEON, D., MIN, K., CHO, W., CHUNG, H., JUNG, T., JUNG, K. & CHAE, C. (2002). Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Pigs in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science* **64** (1), 71-73.
- COCHRANE, R.L. & THOMSON, T.D. (1990). The determination of tylosin residues in lung and serum following administration of Tylan® 200 by intramuscular injection to pigs. Unpublished study T1Z769002 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.
- CODONY, R., COMPAÑÓ, R., GRANADOS, M., GARCÍA-REGUEIRO, J.A. & PRAT, M.D. (2002). Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **959**, 131-141.
- CRAIG, W.A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1-10.
- DE LIGUORO, M., ANFOSSI, P., ANGELETTI, R. & MONTESISSA, C. (1998). Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography. *Analyst* **123**, 1279-1282.
- DEBONO, M., WILLARD, K.E., KIRST, H. A., WIND, J.A., CROUSE, G.D., TAO, E.V., VICENZI, J.T., COUNTER, F.T., OTT, J.L. & OSE, E.E. (1989). Synthesis and antimicrobial evaluation of 20-deoxo-20-(3,5-dimethylpiperidine-1-yl)desmicosin (Tilmicosin, EL-870) and related cyclic amino derivatives. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **42**, 1253-1267.

DEL-POZO, J., CRUMLISH, M., FERGUSON, H.W. & TURNBULL, J.F. (2009). A retrospective cross-sectional study on “Candidatus arthromitus” associated rainbow trout gastroenteritis (RTGE) in the UK. *Aquaculture* **290**, 22–27.

DEL-POZO, J., CRUMLISH, M., FERGUSON, H.W., GREEN, D.M. & TURNBULL, J.F. (2010). A prospective longitudinal study of “Candidatus arthromitus” associated rainbow trout gastroenteritis in the UK. *Preventive Veterinary Medicine* **94**, 289-300.

DELÉPINE, B., HURTAUD, D. & SANDERS, P. (1994). Identification of tylosin in bovine muscle at the maximum residue limit level by liquid chromatography-mass spectrometry, using a particle beam interface. *Analyst* **119**, 2717-2721.

DELÉPINE, B., HURTAUD-PESSEL, D. & SANDERS, P. (1996). Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **79**, 397-404.

DOWNS, O.S. & NEGILSKI, D.S. (1985a). The acute oral, dermal, and ocular toxicity of granulated tylosin concentrate. Unpublished studies Nos R-0-365-79, R-0-366-79, B-D-109-79 and B-E-94-79 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

DOWNS, O.S. & NEGILSKI, D.S. (1985b). The acute oral, dermal, ocular and inhalation toxicity of Tylan 200 Injection. Unpublished studies Nos R-0-344-79, R-0-343-79, B-D-103-79, B-E-87-79 and R-H-39-79 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

DOUTHWAITE, S. (2001). Structure-activity relationships of ketolides vs. macrolides. *Clinical Microbiology and Infection* **7** (3), 11-17.

DOUTHWAITE, S. & CHAMPNEY W. (2001). Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 1-8.

- DOWLING, P.M., WILSON, R.C., TYLER, J.W. & DURAN, S.H. (1995). Pharmacokinetics of ciprofloxacin in ponies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **18**, 7-12.
- DRAISCI, R., PALLESCHI, L., FERRETTI, E., ACHENE, L. & CECILIA, A. (2001a). Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **926**, 97-104.
- DREWS, J., GEORGOPOULOS, A., LABER, G., SCHUTZE, E. & UNGER, J. (1975). Antimicrobial activities of 81.723 hf, a new pleuromutilin derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **7**(5), 507-516.
- DRUSANO, G. (2001). Pharmacodynamic and pharmacokinetic considerations in antimicrobial selection: focus on telithromycin. *Clinical Infectious Diseases* **7**(3), 24-29.
- DRUSANO, G.L. & CRAIG, W.A. (1997). Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the selection of antibiotics for respiratory tract infections. *Journal of Chemotherapy* **9**(Suppl. 3), 38-44.
- DUBOIS, M., FLUCHARD, D., SOR, E. & DELAHAUT, P. (2001). Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **753**, 189-202.
- DUDRIKOVÁ, E. & LEHOTSKÝ, J. (1998). A comparison of liquid chromatographic and microtitre test procedures for determining the depletion of tylosin in healthy lactating cows. *Milchwissenschaft* **53**, 90-92.
- DUTHU, G.S. (1985). Interspecies correlation of the pharmacokinetics of erythromycin, oleandomycin and tylosin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **74**, 943-946.
- EL-SAYED, M.G.A., EL-ATTAR, H.M., ATEF, M. & YOUSIF, M. (1986). Pharmacokinetic profile of tylosin in mastitic cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **93**, 326-328.

EMA, European Medicines Agency (2009). Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health EMA/CVMP/SAGAM/741087/2009, pp. 2-42, London U.K.

EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (1997). Tylosin. Summary report (3). EMA/MRL/205/97-FINAL, pp. 2-8, London, U.K.

EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2000). Tylosin (Extension to eggs). Summary report (4). EMA/MRL/732/00-FINAL, pp.1-3, London U.K.

EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2001). Note for guidance on the risk analysis approach for residues of veterinary medicinal products in food of animal origin. EMA/CVMP/187/00-FINAL, pp.2-11, London, U.K.

EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2002a). Tylosin (Extension to all food producing species). Summary report (5). EMA/MRL/829/02-FINAL, pp.1-2. London, U.K.

EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2002b). Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods- Update application software. EMA/CVMP/563/02-FINAL, London, UK.

EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2008). Guideline on demonstration of target animal safety and efficacy of veterinary medicinal products intended for use in farmed finfish. EMA/CVMP/EWP/459868/2008-CONSULTATION, London, UK.

ESAKI, H., ASAI, T., KOJIMA, A., ISHIHARA, K., MORIOKA, A., TAMURA, Y. & TAKAHASHI, T.(2005). Antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle in Japan from 2001 to 2002. *Journal of Veterinary Medical Science* **67** (1), 75-77.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0 (2004). Tylosin for veterinary use. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, Council of Europe, Strasbourg, vol. 2, pp. 2647-2648.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. (1969). Specifications for the Identity and Purity of Food Additives and their Toxicological Evaluation: Some antibiotics (Twelfth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), FAO Nutrition Meetings Report Series No. 45; WHO Technical Report Series No. 430.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization (1991). Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Foods (Thirty-Eighth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series No. 815.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). Tylosin. First draft prepared by Lewicki, J., Reeves, P.T. and Swan, G.E. Addendum to the monograph prepared by the 38th Meeting of the Committee and published in FAO Food and Nutrition Paper 41/4.

FDA, Food and Drug Administration. (2005). Tylan (tylosin tartrate) soluble. In: NADA 013-076. Freedom of Information Summary, Supplemental New Animal Drug Application, pp. 1-12. Available at the website of the Center for Veterinary Medicine, US Food and Drug Administration, at: <http://www.fda.gov/cvm/foi/013-076s101705.pdf>

GAD, W., HAUCK, R., KRÜGER, M. & HAFEZ, H.M. (2011). Determination of antibiotic sensitivities of *Clostridium perfringens* isolates from commercial turkeys in Germany in vitro. *Archiv Fur Geflugelkunde* **2**, 80-83.

GARRIOTT, M.L., MICHAELIS, K.C. & GRIES, C.L. (1991). The effect of tylosin on the induction of forward mutation at the HGPRT⁺ locus of Chinese hamster ovary cells. Unpublished study No. 910612CHO3279 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

- GAYNOR, M. & MANKIN, A.S. (2005). Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Frontiers in Medicinal Chemistry* **2**, 21-35.
- GHARAIBEH, S., AL-RIFAI, R. & AL-MAJALI, A. (2010). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. *Anaerobe* **16**, 586-589.
- GIBALDI, M., NAGASHIMA, R. & LEVY, G. (1969). Relationship between drug concentration in plasma or serum and amount of drug in the body. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **58**, 193-197.
- GIBREEL, A. & TAYLOR, D.E. (2006). Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**(2), 243-255.
- GIGUÈRE, S. (2006). Macrolides, azalides, and ketolides. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine (4th edition), ed. Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Dowling P.M., Blackwell Publishing, pp. 191-205.
- GINER, S., CANÓS, M., RODILLA, F. & FERRER, C. (1995). Nuevos macrólidos ¿superan a eritromicina?. *Farmacia Hospitalaria* **19** (4), 259-265.
- GINGERICH, D.A. BAGGOT, J.D & KOWALSKI, J.J. (1977). Tylosin antimicrobial activity and pharmacokinetics in cows. *Canadian Veterinary Journal* **18** (4), 96-100.
- GONZÁLEZ, J., BARRETO, J., RODRÍGUEZ, M., PINO, P. & LIM, N. (1998). Macrólidos. *Acta Médica* **8** (1), 71-74.
- GRIES, C.L. (1980). Compound 27892 (tylosin), studies R-287 and R-297. Unpublished memorandum to Dr M.E. Amundson from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- GRIES, C.L. & YOUNG, S.S. (1982). Positive correlation of body weight with pituitary tumor incidence in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, **2**(3), 145-148.
- GRIES, C.L., DOWNS, O.S. & NEGILSKI, D.S. (1985a). The acute oral, dermal and ocular toxicity of granulated tylosin concentrate. Unpublished report dated April, 1985

with studies R-O-365-79, R-366-79, B-D-109-79, and B-E-94-79 from Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to WHO by Lilly Research Centre Ltd., Windlesham, Surrey, England.

GRIES, C.L., DOWNS, O.S. & NEGILSKI, D.S. (1985b). The acute oral, dermal, ocular and inhalation toxicity of tylan 200 injection. Unpublished report dated September 1985 with studies R-O-344-79, R-O-343-79, B-D-103-79, B-E-87-79, and R-H-39-79 from Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to WHO by Lilly Research Centre Ltd., Windlesham, Surrey, England.

GRIES, C.L., NEGILSKI, D.S. & DOWNS, O.S. (1985c). The acute oral, dermal, ocular and inhalation toxicity of tylan soluble. Unpublished report dated September 1985 with studies R-O-367-79, R-O-368-70, B-D-94-79, B-E-90-79, and R-H-40-79 from Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to WHO by Lilly Research Centre Ltd., Windlesham, Surrey, England.

GRIES, C.L., PARTON, J.W. & GARRIOTT, M.L. (1990). The effect of tylosin (compound 027892) on the in vivo induction of micronuclei in bone marrow of ICR mice. Unpublished study No. 891212MNT3279 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

GIGUÈRE, S. (2006). Macrolides, azalides and ketolides. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. S. Giguère, J. D. Prescott and R. D. Baggot (Eds.). Oxford, Blackwell Oxford, pp. 191-205.

GUTIÉRREZ, C.B. & RODRÍGUEZ, E.F. (1993). In vitro susceptibility of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* strains isolated from swine to 42 antimicrobial agents. *Entsalblatt für Bakteriologie*, **279**, 387-393.

HAMILL, R.L. & STARK, W.M. (1964). Macrocin, a new antibiotic, and lactenocin, an active degradation product. *Journal of Antibiotics* **17**, 133-139.

HAMILL, R.L., M.E. HANEY, M. STAMPER & P.F. WILEY. (1961). Tylosin, a new antibiotic: I. Isolation, properties, and preparation of desmycosin, a microbiologically active degradation product. *Antibiotics & Chemotherapy* **11**, 328-334.

HAMILTON-MILLER, J.M. & SHAH, S. (2002). Activity of ketolide ABT-773 (cethromycin) against erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: correlation with extended MLSK phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50** (6), 907-913.

HAMSCHER, G., LIMSUWAN, S., RANSAKUL, N., & KIETZMANN, M. (2006). Quantitative analysis of tylosin in eggs by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry: residue depletion kinetics after administration via feed and drinking water in laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9017-9023.

HANDY, P.R. & MATSUOKA, T. (1978). Tylosin tissue residues in calves following oral feeding of tylosin tartrate. Experiment No. 659-G-128-45. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

HARDY, D.J., HENSEY, D.M., BEYER, J.M., VOJTKO, C., MCDONALD, E.J. & FERNANDES, P.B. (1988). Comparative in vitro activities of new 14-, 15-, and 16-membered macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32** (11), 1710-1719.

HARRIS, P.N. (1961). Chronic toxicity study R3-59. Unpublished study No. R3-59 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

HELLER, D.N. & NOCHETTO, C.B. (2004). Development of multiclass methods for drug residues in eggs: silica SPE cleanup and LC-MS/MS analysis of ionophore and macrolide residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6848-6856.

HIDALGO, A., CARVAJAL, A., GARCÍA-FELIZ, C., OSORIO, J. & RUBIO, P. (2009). Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Research in Veterinary Science* **87**, 7-12.

HJERPE, C.A. (1979). A comparison of serum antibiotic concentrations achieved in calves with intratracheal administration of procaine penicillin G, ampicillin trihydrate, tylosin, oxytetracycline hydrochloride, chloramphenicol sodium succinate,

dihydrostreptomycin sulfate and neomycin sulfate with those achieved with intravenous, intramuscular and subcutaneous administration. *Bovine Practice* **14**, 18-26.

HJERPE, C.A. & ROUTEN, T.A. (1976). Practical and theoretical considerations concerning treatment of bacterial pneumonia in feedlot cattle, with special reference to antimicrobial therapy. In: *Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners*. Annual Meeting, San Francisco, USA. pp. 97–140.

HORIE, M., SAITO, K., ISHII, R., YOSHIDA, T., HARAMAKI, Y. & NAKAZAWA, H. (1998). Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **812**, 295-302.

HOYT, J.A. & HIGDON, G.L. (1991). A reproduction study of rats fed diets containing tylosin: Data tables for reproduction and progeny indices. Unpublished report No. R-1176 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

HRANJEC, M., STARCEVIC, K., ZAMOLA, B., MUTAK, S., DEREK, M., & KARMINSKI-ZAMOLA, G. (2002). New amidino-benzimidazolyl derivatives of tylosin and desmycosin. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **55**, 308-314.

HU, D. & COATS, J.R. (2007). Aerobic degradation and photolysis of tylosin in water and soil. *Environmental Toxicology & Chemistry* **26**, 884-889.

HU, D., FULTON, B., HENDERSON, K. & COATS, J. (2008). Identification of tylosin photoreaction products and comparison of ELISA and HPLC methods for their detection in water. *Environmental Science & Technology* **42**, 2982-2987.

HYATT, J.M.; MCKINNON, P.S.; ZIMMER, G.S. & SCHENTAG, J.J. (1995). The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome: focus on antibacterial agents. *Clinical Pharmacokinetics* **28**, 143-160.

INGALLINELLA, P., DI MARCO, A., TALIANI, M., FATTORI, D. & PESSI, A. (2001). A new method for chemoselective conjugation of unprotected peptides to dauno- and doxorubicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **11**, 1343-1346.

IRITANI, Y., HIDAKA, S., KITABATAKE, T. & ISE, T. (1975). Tylosin levels in the tissue of pig after medication in drinking water. *Japanese Journal of Zootechnical Science* **48**, 588-590.

IVEKOVIĆ, D., LOPOTAR, N., BRAJŠA, K. & MANDIĆ, Z. (2003). Electrochemical reduction of desmycosin, structure investigation and antibacterial evaluation of the resulting products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **18**, 323-328.

JACOBS, M.R., BAJAKSOUZIAN, S., ZILLES, A., LIN, G., PANKUCH, G.A. & APPELBAUM, P.C. (1999). Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. surveillance study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1901–1908.

JASPER, D.E., JAANJECKIN, N.C. & BRAZIL, L.H. (1966). Clinical and laboratory observation on bovine mastitis due to mycoplasma. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **148**, 1017-1029.

JIMÉNEZ, R., PIRIZ, S., MATEOS, E. & VADILLO, S. (2004). Minimum inhibitory concentrations for 25 selected antimicrobial agents against *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium* strains isolated from footrot in Sheep of Portugal and Spain. *Journal of Veterinary Medicine* **51**, 245–248.

JIN, LY, HYOUNG-JOON, M, BO-KYU, K, MAN, K.J., WAN-KYU, L. (2014). *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* field isolates collected from swine lung specimens in Korea. *Journal of Swine Health and Production* **22**(4), 193-196.

JUHEL-GAUGAIN, M., ANGER, B. & LAURENTIE, M. (1999). Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **82**, 1046-1053.

KARLSSON, M., OXBERRY, S. L. & HAMPSON, D. J. (2002). Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Veterinary Microbiology* **84**, 123-133.

KARLSSON, M., FELLSTROM, C., HELDTANDER, U.K., JOHANSSON, K.E. & FRANKLIN, A. (1999). Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira* (Serpulina) *hyodysenteriae*. *FEMS Microbiology Letters* **172**(2), 255-260.

KARLSSON, M., FELLSTROM, C., JOHANSSON, K.E. & FRANKLIN, A. (2004). Antimicrobial resistance in *Brachyspira pilosicoli* with special reference to point mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide and lincosamide resistance. *Microbial Drug Resistance* **10**(3), 204-208.

KEHR, C.C., HAMELINK, J.L., BRANNON, D.R. & AMUNDSON, M.E. (1978a). The toxicity of compound 27892 (tylosin) to bobwhite quail in an acute oral study. Unpublished study No. 7017-78 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

KEHR, C.C., HAMELINK, J.L., BRANNON, D.R. & AMUNDSON, M.E. (1978b). The toxicity of compound 27892 (tylosin) to bobwhite quail in an eight day dietary study. Unpublished study No. 7025-78 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

KEHR, C.C., HAMELINK, J.L., BRANNON, D.R. & AMUNDSON, M.E. (1978c). The toxicity of compound 27892 (tylosin) to mallard ducks in an eight-day dietary study. Unpublished study No. 7022-78 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

KELICH, S.L. & BYRD, R.A. (1991). Teratology studies of tylosin in mice and rats: Summary tables and figures. Unpublished report from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

KENG, L.J.-Y. & BOISON, J.O. (1992). High performance liquid chromatographic determination of tylosin in bovine muscle, kidney and liver. *Journal of Liquid Chromatography* **15**, 2025-2034.

KENNINGTON, A.S., DONOHO, A.L., DARBY, J.M., MORAN, J.W. & OCCOLOWITZ, J.L. (1994a). Tylosin metabolism study in tissues and excreta of calves injected with ¹⁴C-tylosin. Unpublished GLP study No. T1Z749302 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

KIETZMANN, M. (1985). Comparative study of the distribution and excretion of tylosin of various origins. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **92**, 147-149.

KIM, B., MIN, K., CHOI, C., CHO, W., CHEON, D., KWON, D., KIM, J. & CHAE, C. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Korean using new standardized procedures. *Journal of Veterinary Medical Science* **63**(3), 341-342.

KIM, M.H., GEBRU, E., CHANG, Z.Q., CHOI, J.Y., HWANG, M.H., KANG, E.H., LIM, J.H., YUN, H.I. & PARK, S.C. (2008). Comparative pharmacokinetics of tylosin or florfenicol after a single intramuscular administration at two different doses of tylosin-florfenicol combination in pigs. *Journal of Veterinary Medical Science* **70**, 99-102.

KINDIG, D.E.F. (1990). The effect of tylosin on the in vitro induction of chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells. Unpublished studies Nos 891109CTX3279, 891129CAB3279 and 891220CAB3279 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

KINYON, J. M., MURPHY, D., STRYKER, C., TURNER, V., HOLCK, J. T. & DUHAMEL, G. (2002) Minimum inhibitory concentration for US swine isolates of *Brachyspira pilosicoli* to valnemulin and four other antimicrobials. Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA, Vol 2, pp. 50.

KIORPES, A.L. (1993). Relative availability of Tylan® 200 Injection administered subcutaneously and intramuscularly to cattle. Unpublished GLP study No. HWI 6180-110 from Hazelton Wisconsin Inc., Madison, Wisconsin. Sponsor submitted.

KIRST, H. & SIDES, G. (1989). New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 1419-1422.

KIRST, H. A., TOTH, J. E., DEBONO, M., WILLARD, K. E., TRUEDELL, B. A., OTT, J. L., COUNTER, F. T., FELTY-DUCKWORTH, A. M. & PEKAREK, R. S. (1988). Synthesis and evaluation of tylosin-related macrolides modified at the aldehyde function(a new series of orally effective antibiotics). *Journal of Medicinal Chemistry* **31**, 1631-1641.

KOJIMA, A., MORIOKA, A., KIJIMA, M., ISHIHARA, K., ASAI, T., FUJISAWA, T., TAMURA, Y. & TAKAHASHI, T. (2010). Classification and antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from apparently healthy food-producing animals in Japan. *Zoonoses Public Health* **57**, 137–141.

KOWALSKI, C., ROLINSKI, Z., ZAN, R. & WAWRON, W. (2002). Pharmacokinetics of tylosin in broiler chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **5**, 127-130.

KOWALSKI, C & POMORSKA, M. (2006). Evaluation of bioequivalence of two tylosin formulations after oral administration in broiler chickens. *Annales Universitatis Mariae Curie* **61** (3), 25-29.

KUCERS, A., CROWE, S., GRAYSON, M.L. & HOY, J.F. (1997). The use of antibiotics. 5th ed. Oxford: Butterworth Heinemann.

KUWABARA, S. (Undated). A study on the effect of a continuous and minute amount of tylosin on human intestinal flora. Unpublished study from the Medical Department, Toho University, Tokyo, Japan. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

LACEY, R.W. (1987). Rarity of tylosin resistance in human pathogenic bacteria. Unpublished report from the Department of Microbiology, University of Leeds, Leeds, England. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

LACOSTE, E. (2003). Pharmacokinetic study of tylosin in broiler chicken using an aqueous solution (via the intravenous route and oral gavage) and as a feed slurry (via oral gavage). Unpublished GLP study No. T1YAFR0202 from Avogadro, Parc de Génibrat, Fontenilles, France. Sponsor submitted.

LAKRITZ, J., WILSON, W.D. & MIHALYI, J.M. (1999). Comparison of microbiologic and high-performance liquid chromatography assays to determine plasma concentrations, pharmacokinetics, and bioavailability of erythromycin base in plasma of foals after intravenous or intragastric administration. *American Journal of Veterinary Research* **60**, 414-419.

LEAL, C., CODONY, R., COMPAÑÓ, R., GRANADOS, M. & PRAT, M.D. (2001). Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **910**, 285-290.

LEES, P. & ALIABADI, F.S. (2002). Rational dosing of antimicrobial drugs; animals versus humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 269-284.

LEWICKI, J., REEVES, P.T. & SWAN, G.E. (1991). Tylosin. Addendum to the monograph prepared by the 38th Meeting of the Committee and published in FAO Food and Nutrition Paper 41/4. pp 37.

LEWICKI, J. (2006). Tylosin. A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. Available at the website of FAO at: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/tylosin_2006.pdf

LITTERIO, N.J., CALVINHO, L.F., FLORES, M.M., TARABLA, H.D. & BOGGIO, J.C. (2007). Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts. *Journal of Veterinary Medicine Series A Physiology, Pathology, Clinical Medicine* **54**, 30-35.

- LOCKE, D., BUSH, M. & CARPENTER, J.W. (1982). Pharmacokinetics and tissue concentrations of tylosin in selected avian species. *American Journal of Veterinary Research* **43**, 1807-1810.
- LODE, H., BOECHK, M. SCHABERG, T. BORNER, K. & KOEPPE, P. (1993). Pharmacology of macrolides. In: Neu, H.C., Young, L.S., Zinner, S.H., eds. The new macrolides, azalides and streptogramins. New York: Marcel Dekker, pp 61-68.
- LORIA, G.R. SAMMARTINO, C., NICHOLAS, R.A.J. & AYLING, R.D. (2003). In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Research in Veterinary Science* **75**, 3-7.
- LOVMAR, M., NILSSON, K., LUKK, E., VIMBER, V., TENSON, T. & EHRENBURG, M. (2009). Erythromycin resistance by L4/L22 mutations and resistance masking by drug efflux pump deficiency. *The EMBO Journal* **28**(6), 736-744.
- MADGWICK, L., MAYER, S. & KEEN, P. (1989). Penetration of antibiotics into bovine neutrophils and their activity against intracellular *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **24** (5), 709-718.
- MADSEN, A. & MORTENSEN, H.P. (1986). Large quantities of tylosin in the feedstuff for swine during the last two weeks before slaughter. National Institute of Animal Science, Denmark. Announcement No. 623.
- MALIN, B. & SILLIKER, J.H. (1966). Low level tylosin and the emergence of antibiotic-resistant bacteria in humans. Abstract, American Society of Microbiology 6th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Philadelphia, PA, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- MARTH, J.L., BURNETT, T.J., KIEHL, D.E., DA, D.H. & FOSSLER, S.C. (2000). ¹⁴C-tylosin metabolism and residue decline in laying hens administered medicated drinking water: part 2 of 2: analysis and characterization of radioactive residues in tissues and excreta. Unpublished GLP study No. T1Y729901 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

MARTÍN DE LA FUENTE, A.J., TUCKER, J., NAVAS, A.W., BLANCO, M., MORRIS, S.J. & GUTIERREZ-MARTÍN, C.B. (2007). Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology* **120**, 184–191.

MASIERO, F., SILVEIRA, R.O., SADANÃ, P., COULAUD, E., SILVA, I., DE CARVALHO, R.M. & FARIA, F.C. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from piglets with or without diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**(3), 1030-1033.

MATSUBARA, H., INOKOSHI, J., NAKAGAWA, A., TANAKA, H. and OMURA, S. (1983). Chemical modification of tylosin: synthesis of amino derivatives at C-20 position of tylosin and demycarosyltylosin. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **36**, 1713-1721.

MATSUOKA, T. & JOHNSON, W.S. (Undated a). Injection site and tissue residue in cattle following injection of tylosin. Experiment No. 659-G112-272. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MATSUOKA, T. & JOHNSON, W.S. (Undated b). Injection site and tissue residue in cattle following injection of tylosin. Experiment No. 659-G112-295. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MATSUOKA, T. & JOHNSON, W.S. (Undated c). Injection site and tissue residue in cattle following injection of tylosin. Experiment No. 659-G112-281. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MÁTTAR, S., MARTÍNEZ, P. & PUERTA, H. (2007) Terapéutica antibacteriana y principales mecanismos de resistencia. Cap. 5. Familia de los macrólidos y ketólidos. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia, pp. 132-141.

McFARLAND, J.W., BERGER, C.M., FROSHAUER, S.A., HAYASHI, S.F., HECKER, S.J., JAYNES, B.H., JEFSON, M.R., KAMICKER, B.J., LIPINSKI, C.A.,

- LUNDY, K.M., REESE, C.P. & VU, C.B. (1997). Quantitative structure-activity relationships among macrolide antibacterial agents: in vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 1340-1346.
- McGUIRE, J.M., BONIECE, W.S., HIG-GINS, C.E., HOEHN, M.M., STARK, W.M., WEST-HEAD, J. & WOLFE, R.N. (1961). Tylosin, a new antibiotic: I. Microbiological studies. *Antibiotics and Chemotherapy* **11**, 320-327.
- MENSA, J., GARCÍA, E. & VILA, J. (2003). Macrólidos, cetólidos y estreptograminas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **21** (4), 200-208.
- MERCK (1976). The Merck Index. Merck and Co., Inc., (9 ed.) Rahway, New York.
- MICHAELIS, K.C. (1990). The effect of tylosin on the induction of forward mutation at the thymidine kinase locus of L5178Y mouse lymphoma cells. Unpublished studies Nos 891011MLT3279, 891017MLA3279 and 891114MLA3279 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- MICHEL, C., BERNARDET, J.F., DANIEL, P., CHILMONCZYK, S., URDACI, M.C., & DE KINKELIN, P. (2002). Clinical and aetiological aspects of a summer enteritic syndrome associated with the sporulating segmented filamentous bacterium “*Candidatus arthromitus*” in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **25**, 533–543
- MODRIC, S., WEBB, A.I. & DERENDORF, H. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **21**, 444-452.
- MORAN, J.W., COLEMAN, M.R., THOMSON, T.D. & COCHRANE, R.L. (1990a). The determination of tylosin residue in tissues following administration of Tylan 200 by intramuscular injection to weaned calves. Experiment No. T1Z709002. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MORAN, J.W., COLEMAN, M.R., THOMSON, T.D. & COCHRANE, R.L. (1990b). The determination of tylosin residue in tissues following administration of Tylan soluble in drinking water to broiler chickens. Experiment No. T1Y709002. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MORAN, J.W., COLEMAN, M.R., THOMSON, T.D. & COCHRANE, R.L. (1990c). The determination of tylosin residue in tissues following administration of Tylan premix to broiler chickens. Experiment No. T1X709002. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MORAN, J.W., COLEMAN, M.R., THOMSON, T.D. & COCHRANE, R.L. (1990d). The determination of tylosin residue in tissues following administration of Tylan 200 by intramuscular injection to growing pigs. Experiment No. T1Z709001. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MORAN, J.W., COLEMAN, M.R., THOMSON, T.D. & COCHRANE, R.L. (1990e). The determination of tylosin residue in tissues following administration of Tylan soluble in drinking water of growing pigs. Experiment No. T1Y709001. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MORAN, J.W., COLEMAN, M.R., THOMSON, T.D. & COCHRANE, R.L. (1990f). The determination of tylosin residue in tissues following administration of Tylan premix in growing ration to pigs. Experiment No. T1X709001. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

MORTON, D.M. (1988). Tylan products. Expert report on toxicological documentation. Unpublished report from Lilly Research Laboratories. Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health. Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

MURAKAWA, T., SAKAMOTO, H., HIROSE, T. & NISHIDA, M. (1980). New *in vitro* kinetic model for evaluating bactericidal efficacy of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**, 377-381.

MURRAY, B.E. (1998). Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infectious Disease Journal* **4**, 37-44.

NARANDJA, A., KELNERIĆ, Z., KOLACNY-BABIĆ, L. & DJOKIĆ, S. (1995). 10,11,12,13-Tetrahydro derivatives of tylosin. II. Synthesis, antibacterial activity and tissue of 4'-deoxy-10,11,12,13- tetrahydrodesmycosin. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) **48**, 248-253.

NEGILSKI, D.S. & DOWNS, O.S. (1985). The acute oral, dermal, ocular and inhalation toxicity of Tylan Soluble. Unpublished studies Nos R-0-367-79, R-0-368-79, B-D-94-79, B-E-90-79 and R-H-40-79 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

NEU, H.C. (1991). The development of macrolides: Clarithromycin in perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **27**, 1-9.

NOUWS, J.F.M. & ZIV, G. (1977a). The persistence of antibiotic residues at the intramuscular injection site of dairy cows. *Reference Veterinary* **34**, 131-135.

NOUWS, J.F.M. & ZIV, G. (1977b). Tissue distribution and residues of tylosin in normal and emergency-slaughtered dairy cows and calves. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* **28**, 92-94.

NOUWS, J.F.M. & ZIV, G. (1979). Distribution and residues of macrolide antibiotics in normal dairy cows. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* **30**, 202-208.

NOUWS, J.F.M. & ZIV, G. (1980). Distribution and residues of macrolide antibiotic in normal dairy cows. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* **30**, 202-208.

OIE, World Organisation for Animal Health. (2007). OIE list of antimicrobials of veterinary importance. Retrieved June, 2010, from http://www.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf.

- PARKER, R.M., PATEL, R.K.P., MCLAREN, I.M. & FRANCIS, P.G. (1994). Residues of tilmicosin in milk of sheep after subcutaneous administration. Proceeding of the European association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, 6th International Congress. Edinburgh, UK. pp 226-227.
- PAESEN, J., CYPERS, W., PAUWELS, E., ROETS, J. & HOOGMARTENS, J. (1995a). Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **13**, 1153-1159.
- PAESEN, J., CLAEYS, P., CYPERS, W., ROETS, J. & HOOGMARTENS, J. (1995b). Liquid chromatography of tylosin A and related substances on poly(styrene-divinylbenzene). *Journal of Chromatography A* **699**, 93-97.
- PAESEN, J., CYPERS, W., BUSSON, R., ROETS, J. & HOOGMARTENS, J. (1995c). Isolation of decomposition products of tylosin using liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **699**, 99-106.
- PFISTER, P., JENNI, S., POEHLSCGAARD, J., THOMAS, A., DOUTHWAITE, S., BAN, N. & BÖTTGER, E.C. (2004). The structural basis of macrolide-ribosome binding assessed using mutagenesis of 23S rRNA positions 2058 and 2059. *Journal of Molecular Biology* **342** (5), 1569-1581.
- PLUMB, D.C. (ED.) (2002). Veterinary Drug Handbook (4th edition), Iowa State Press a Blackwell Publishing Company, Iowa, USA.
- POST, K.W., COLE, N.A. & RALEIGH, R.H. (1991). In vitro antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* recovered from cattle with bovine respiratory disease complex. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **3**, 124-126.
- POST, K.W. & SONGER, J.G. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. *Anaerobe* **10**, 47-50.
- POULSEN, S.M., KOFOED, C. & VESTER, B. (2000). Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *Journal of Molecular Biology* **304**, 471-481.

PRATS, C., FRANCESCH, R., ARBOIX, M. & PÉREZ, B. (2001). Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **766**, 57-65.

PRATS, C., FRANCESCH, R., ARBOIX, M. & PÉREZ, B. (2002a). Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. *Biomedical and Life Sciences* **766**, 57-65.

PRATS, C., EL-KORCHI, G., FRANCESCH, R., ARBOIX, M. & PEREZ, B. (2002b). Disposition kinetics of tylosin administered intravenously and intramuscularly to pigs. *Research in Veterinary Science* **73**, 141-144.

PRESCOTT, J.F. & BAGGOT, J.D. (Eds) (1991). Lincosamides y macrolides. In: *Therapeutica antimicrobiana Veterinaria*. Acribia, S.L., Zaragoza, España, pp. 181-212.

PRESCOTT, J.F. & BAGGOT, J.D. (Eds) (1993). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 2nd Ed. Ames: Iowa State University Press, Iowa, USA.

PRESCOTT, F. (2008). History of antimicrobial usage in agriculture: an overview. In: *Guide to antimicrobial use in animals*. Guardabassi, L., Jensen, L.B. and Kruse, H. Oxford, U.K., Blackwell Publishing Ltd., pp. 19-28.

PRIDMORE, A. (2006). Non-clinical laboratory study: Activity of tylosin against bacterial strains representing the normal human intestinal microbiota: Determination of minimum inhibitory concentration (MIC). Unpublished study No. 039/05 from Don Whitley Scientific Limited, Shipley, West Yorkshire, England. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

QUARLES, J.P. (1983). Acute comparative intravenous toxicity testing of tylosin, desmycosin and macrocin in the ICR mouse. Unpublished studies No. M-V-46-83, M-V-45-83 y M-V-44-83 from the Toxicology Division, Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

REGLAMENTO (CEE) nº 2377/90 del CONSEJO, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de

residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Comunidad Europea* **L 224**, de 18 de agosto de 1990.

REGLAMENTO (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L 015**, de 20 de enero de 2009.

RETSEMA, J. & FU, W. (2001). Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents* **18**, S3-S10.

RICHARDS, E.A. & BERKMAN, R.N. (1960). Tylosin residues in eggs. Experiment No. VPR-87-418. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

RICHARDS, F.A. & BERKMAN, R.N. (undated). LD50 determination for tylosin phosphate in chickens. Unpublished study No. VPR-116-418 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

RICHARDS, E.A., BERKMAN, R.N. & ROSEBROCK, D.W. (Undated). Tylosin residue studies in turkeys. Experiment No. VPR-101-418. Unpublished report, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to FAO by Eli Lilly and Co.

ROBERTS, M.C., SUTCLIFFE, J., COURVALIN, P., JENSEN, L.B., ROOD, J. & SEPPALA, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2823-2830.

ROBERTS, M.C. (2008). Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* **282**(2), 147-159.

ROBERTS, G., CERNIGLIA, C. & PALERMO, J. (2009). Tylosin. In: Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives, Series, 61, 183-211.

ROSS, M.H., BRAS, G. & RAGBEER, M.S. (1970). Influence of protein and caloric intake upon spontaneous tumor incidence of the anterior pituitary gland of the rat. *Journal of Nutrition*, **100**, 177–189.

SANZ, F. (2000). La gastroenteritis de la trucha. *Trouw Informa Spring*, 16–18

SARTI, M., CERVELLIONE, F., GIUSTO, C., MANZANO, M., PECCHINI, A. & LUZZANA, U. (2008). Intestinal microflora modulation as a strategy for the control of rainbow trout gastroenteritis (RTGE). In: XV Convegno Nazionale della Societa` Italiana di Patologia Ittica. Erice, Italy, p. 25.

SAGGIORATO, M., PRADELLA, G., SCANDURRA, S., BACCHIN, C., FERRO, T. & AGNOLETTI, F. (2008). Tylosin MIC distribution from clinical isolates of *Clostridium perfringens* in France, Italy and Spain. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy. June 10-13, 2008. Pathology and Hygiene, 1071-1074.

SAURIT, A.R., RUBIO, M., BARONI, E., SAN, A.M., SANCHEZ, S. & BOGGIO, J.C. (2002). Some comparative aspects of the pharmacokinetics of tylosin in buffaloes and cattle. *Veterinary Research Communications* **26**, 49-54.

SAUTER, R.A., CORBET, H.T. & BAILEY, R.W. (1962). Blood level studies in the bovine, equine and porcine species with tylosin, a new antibiotic. *Veterinary Medicine* **57**, 982-986.

SCHALM, O.W. & JASPER, O.E. Mastitis. In Bovine Medicine Surgery. Edited by Gibbons, W.J., Catcott, E.J. and Smithcors. J.F. Wheaton, Illinois: American Veterinary Publications, Inc. pp. 718-724.

SCHENTAG, J.J. (1989). Clinical significance of antibiotic tissue penetration. *Clinical Pharmacokinetics* **16**(Suppl. 1), 25-31.

SCHENTAG, J.J. (2000) Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. *Clinical Infectious Diseases* **31**(Suppl. 2), S40-44.

SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S., WOODFORD, N., VAN DUIJKEREN, E., JOHNSON, A.P. & GAASTRA, W. (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Veterinary Microbiology* **141** (1-2), 1-4.

SERAL, C., VAN BAMBEKE, F., & TULKENS, P.M. (2003). Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (7), 2283-2292.

SHADDAD, A.I., SAMIA HASSAN, A.A., ELTAYEB, I.B., OMER, M.A., NOUR, A.O.M., AL-NAZAWI, M.H. & HOMEIDA, A.M. (2007). Pharmacokinetics of tylosin in desert sheep after intramuscular injection. *Research Journal of Pharmacology* **1** (1), 19-22.

SHAIN, C.S. & AMSDEN, G.W. (2002). Telithromycin: the first of the ketolides. *The Annals of Pharmacotherapy Journal* **36** (3), 452-464.

SHIOMI, K. & OMURA, S. (2002). Discovery of new macrolides. In: Macrolide Antibiotics. S. Omura (Ed.), 2nd Edition. Academic Press, Amsterdam, pp 1-56.

SIECK, R.F., GRAPER, L.K., GIERA, D. D., HERBERG, R.J. & HAMILL, R.L. (1978a). ¹⁴C tylosin tissue residue study in swine. Unpublished Report dated November 1978 from Agricultural Biochemistry, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to WHO by Lilly Research Centre Ltd., Windlesham, Surrey, England.

SIECK, R.F., GRAPER, L.K., GIERA, D. D., HERBERG, R.J. & HAMILL, R.L. (1978b). Metabolism of tylosin in swine and rat. Unpublished Report dated November 1978 from Agricultural Biochemistry, Lilly Research Laboratories, Greenfield, Indiana. Submitted to WHO by Lilly Research Centre Ltd., Windlesham, Surrey, England.

SIUGZDAITE, J., GABINAITIENE, A. & KERZIENE, S. (2012). Susceptibility of *Mycoplasma bovis* field isolates to antimicrobial agents. *Veterinari Medicina* **57** (11), 575–582.

STAKENBORG, T., VICCA, J., BUTAYE, P., MAES, D., MINION, F.C., PEETERS, J., DE KRUIF, A & HAESEBROUK, F. (2005). Characterization of In Vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microbial Drug Resistance* **11**(3), 290-294.

STEBLER, T. & GUENTERT, TW. (1990). Binding of drugs in milk: the role of casein in milk protein binding. *Pharmaceutical Research* **7**, 633-637.

SUMBATYAN, N.V., KORSHUNOVA, G.A. & BOGDANOV, A.A. (2003). Peptide Derivatives of Antibiotics Tylosin and Desmycosin, Protein Synthesis Inhibitors. *Biochemistry (Moscow)* **68** (10), 1156-1158.

TAHA, A.A., ELSHEIKH, H.A. & KHALAFALLA, A.E. (1999). Disposition kinetics of tylosin administrated intravenously and intramuscularly in Desert sheep and Nubian goats. *The Veterinary Journal* **158**, 210–215.

TEETER, J.S. & MEYERHOFF, R.D. (2003). Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research* **93**, 45-51.

TERASHIMA, H. & MAEDA, J. (Undated). The effect of tylosin on a fetus and a suckling-young of Wistar strain rat. Department of Pathology, Osaka City University Medical School, Osaka City, Japan. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

THOMSON, T.D. (Undated a). Relative bioavailability of TYLAN 200 injection administered subcutaneously and intramuscularly in young calves. Unpublished Report T1Z768106 from Lilly Research Laboratories, Animal Science Div., Greenfield, Indiana. Submitted to WHO under 893/IJB200/FAANIM/AM/1-6 by Lilly Research Centre, Windlesham, Surrey, England.

TINDALL, B. (Ed). (1991). *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. 5th edition. London, UK.

TOUTAIN, P.L., DEL CASTILLO, J.R. & BOUSQUET-MELOU, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science* **73**, 105-114.

TRINH, H.T., BILLINGTON, S.J., FIELD, A.C., SONGER, J.G. & JOST, B.H. (2002). Susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* from different sources to tetracycline, macrolide and lincosamide antimicrobial agents. *Veterinary Microbiology* **85** (4), 353–359.

TSUBURA, Y., TOYOSHIMA, K., SANO, S., NISHII, Y. & TANI, M. (Undated). Effect of tylosin on mouse breeding. Unpublished study from Second Department of Pathology, Nara Medical College, Kashihara, Japan. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

TSUCHIKAWA, K. & AKABORI, A. (Undated). On the teratogenicity of tylosin. Unpublished study from National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

UEMURA, R., SUEYOSHI, M. & NAGATOMO, H. (2010). Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* **72** (12), 1661–1663.

URDACI, M.C., REGNAULT, B. & GRIMONT, P.A.D. (2001). Identification by in situ hybridization of segmented filamentous bacteria in the intestine of diarrheic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Research in Microbiology* **152**, 67–73

USLEBER, E., STRAKA, M. & MÄRTLBAUER, E. (1997). Determination of tylosin in milk by reversed-phase liquid chromatography. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **48**, 75-76.

VAN DUYN, R.L. (Undated). Tylosin serum and lung tissue concentrations following intramuscular administration of swine. Unpublished study No. 766-G125-81 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

VAN DUYN, R.L. & FOLKERTS, T.M. (1979). Concentrations of tylosin in blood and lung tissue from calves given single and repeated daily intramuscular doses. *Veterinary Medicine Small Animal Clinic* **74**, 375-377.

VAN DUYN, R.L. & JOHNSON, W.S. (Undated). Tylosin levels in serum and lung tissue from swine injected intramuscularly once with tylosin. Unpublished study No. 766-G125-72 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

VAN DUYN, R.L. & KLINE, R.M. (Undated-a). Tylocine Injection intramuscular canine blood levels. Unpublished Pharmacology study No. VPR-199-766 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

VAN DUYN, R.L. & KLINE, R.M. (Undated-b). Additional studies on the pharmacology and toxicology of Tylocine® Injection in dogs and cats. Unpublished pharmacology study from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

VAN DUYN, R.L. & KLINE, R.M. (Undated-c) Tylosin minigranule oral blood levels in swine. Pharmacological experiment VPR-275-766 submitted to WHO under 893/G/FBLDLV/AM/1-2 by Lilly Research Centre, Windlesham, Surrey, England.

VAN DUYN, R.L. & KLINE, R.M. (Undated-d) Additional studies on the pharmacology and toxicology of Tylocine® Injection in dogs and cats. Unpublished study from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Submitted to WHO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.

VAN DUYN, R.L., KLINE, R.M. & RUSSELL, E. (Undated). Tylocine® intramuscular canine blood levels. Unpublished pharmacology study No. VPR-139-766 from Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Company, Greenfield, IN, USA. Sponsor submitted.

VAN LEEUWEN F.X.R. (1991). Tylosin. In: Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food. Thirty-eight meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO Food Additives, Series 29, International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva 1991, 139-163.

VANDERSSE, R., THEVENET, L., MARRAUD, M., BOGGETTO, N., REBOUD, M. & CORBIER, C. (2003). α -Aminoxy acids as building blocks for the oxime and hydroxylamine pseudopeptide links. Application to the synthesis of human elastase inhibitors. *Journal of Peptide Science* **9**, 282- 299.

VEIEN, N.K., HATTEL, T., JUSTESEN, O. & NORHOLM, A. (1980). Occupational contact dermatitis due to spiramycin and/or tylosin among farmers. *Contact Dermatitis*, **6**, 410–413.

VERBOV, J. (1983). Tylosin dermatitis. *Contact Dermatitis*, **9**, 325–326.

VESTER, B. & S. DOUTHWAITE. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(1): 1-12.

WAGNER, J.G. (Ed.) (1975). Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics. Drug Intelligence Publications, Hamilton, Illinois.

WAGNER, J.G. (1976). Linear pharmacokinetics equations allowing direct calculation of many needed pharmacokinetic parameters from the coefficients and exponents of polyexponential equations which have been fitted to the data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmacy* **4**(5), 443-467.

WANG, J., LEUNG, D. & BUTTERWORTH, F. (2005). Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1857-1865.

WEISEL, M.K., POWERS, J.D., POWERS, T.E. & BAGGOT, J.D. (1977). A pharmacokinetic analysis of tylosin in the normal dog. *American Journal of Veterinary Research* **38**, 273-275.

WHALEY, H.A., PATTERSON, E.L., DORNBUSH, A.C., BACKUS, E.J., & BOHONOS, N. (1963). Isolation and characterization of relomycin, a new antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **161**, 45-48.

WHO, World Health Organization. (1999). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives, Series 29.

WHO, World Health Organization. (2007). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial Resistance due to Non-Human Antimicrobial Use Report of

the Second WHO Expert Meeting Copenhagen, 29–31 May 2007. Retrieved June, 2010, from www.who.int/entity/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf.

WILLIAMS, J & SEFTON, A. (1993). Comparison of macrolide antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**, suppl C, 11-26.

WILSON, R.C. (1984). Macrolides in veterinary medicine. In: *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, and Practice*. 1st edition. Omura S. (Ed.), 1st Edition, Academic Press Inc., Amsterdam, pp. 301-347.

XIONG, Y.Q. & LE, T.P. (2001). Telithromycin (HMR 3647): The first ketolide antibiotic. *Drugs of Today* **37** (9), 617-628.

YAMAOKA, F., NAKAGAWA, T. & UNO, T. (1978). Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **6**(2), 165-75.

YAO, J. & MOELLERING, C.J. (2007). Antibacterial agents. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P.R., Baron, E., Jorgensen, J.H., Landry, M. and Tenover, M. (Eds.) Washington, D.C., USA, ASM Press, pp. 1077-1113.

YOSHIDA, M., HOSHII, H., YONEZAWA, S., NAKAMURA, H. & YAMAOKA, R. (1973). Residue of dietary tylosin in blood, muscle and liver of growing chicks. *Journal of Poultry Science* **10**, 23-28.

YOSHIMURA, H., ISHIMARU, M., ENDOH, Y.S. & KOJIMA, A. (2000). Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from faeces of broiler and layer chickens. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 427-432.

ZATSEPIN, T.S., STETSENKO, D.A., ARZUMANOV, A.A., ROMANOVA, E.A., GAIT, M.J. & ORETSKAYA, T.S. (2002). Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates with single and multiple peptides attached to 2'-aldehydes through thiazolidine, oxime, and hydrazine linkages. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 822-830.

ZHANEL, G.G., DUECK, M., HOBAN, D.J., VERCAIGNE, L.M., EMBIL, J.M., GIN, A.S. & KARLOWSKY, J.A. (2001). Review of macrolides and ketolides. Focus on respiratory tract infections. *Drugs* **61**, 443- 498.

ZIV, G. (1980). Preliminary clinical pharmacological investigations of tylosin and tiamulin in chickens. *Veterinary Quarterly* **2**, 206-210.

ZIV, G. & RISENBERG, R (1991). Oral bioequivalence studies of two tylosin products in broilers and layers. *Praktische Tierarzt* **72**, 860-863.

ZIV G. & SULMAN F.G. (1972). Binding of antibiotics to bovine and ovine serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2**, 206-213.

ZIV, G. & SULMAN, F.G. (1973a). Penetration of lincomycin and clindamycin into milk in ewes. *British Veterinary Journal* **129**, 83-91.

ZIV, G. & SULMAN, F.G. (1973b). Serum and milk concentrations of spectinomycin and tylosin in cows and ewes. *American Journal of Veterinary Research* **34**, 329-333.

ZIV, G., CREVELD, C.V., BEN-ZVI, Z., GLICKMAN, A. & YAGIL, R. (1995). Disposition kinetics of tylosin tartrate administered intravenously and intramuscularly to normal and water-deprived camels. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **18**, 299-305.